ACADÉMIE DE MONTPELLIER N° 11

FACULTÉ DE MÉDECINE

RECHERCHES

SUR LA

RÉACTION A LA PHÉNOLPHTALINE

SA SENSIBILISATION

ET SUR LA

RÉACTION A LA FLUORESCINE

POUR LA RECHERCHE DU SANG DANS L'URINE

ET DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES

(Déductions et Applications cliniques)

:o:

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 23 Décembre 1914

PAR

Paul SANGOUARD

Né à Port-Saïd (Egypte), le 9 avril 1886

EX-PRÉPARATEUR A L'INSTITUT DE BIOLOGIE
ANCIEN EXTERNE DES HOPITAUX ET DE LA MATERNITÉ
EX-PRÉPARATEUR AU SERVICE D'ÉLECTROTHÉRAPIE DES HOPITAUX
ASSISTANT A LA CLINIQUE DES MALADIES DES VOIES URINAIRES DE L'HOPITAL GÉNÉRAL
LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Examinateurs de la Thèse — IMBERT, Professeur, *Président.*
VILLE, Professeur.
GRYNFELTT, Agrégé.
LISBONNE, Agrégé.
Assesseurs

MONTPELLIER
IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE
Rue Ferdinand-Fabre et Quai du Verdanson.

1914

RECHERCHES

SUR LA

RÉACTION A LA PHÉNOLPHTALINE

SA SENSIBILISATION

ET SUR LA

RÉACTION A LA FLUORESCINE

ACADÉMIE DE MONTPELLIER

FACULTE DE MEDECINE

N° 11

RECHERCHES

SUR LA

RÉACTION A LA PHÉNOLPHTALINE

SA SENSIBILISATION

ET SUR LA

RÉACTION A LA FLUORESCINE

POUR LA RECHERCHE DU SANG DANS L'URINE

ET DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES

(Déductions et Applications cliniques)

:o:

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 23 Décembre 1914

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PAR

Paul SANGOUARD

Né à Port-Saïd (Egypte), le 9 avril 1886

EX-PRÉPARATEUR A L'INSTITUT DE BIOLOGIE
ANCIEN EXTERNE DES HOPITAUX ET DE LA MATERNITÉ
EX-PRÉPARATEUR AU SERVICE D'ÉLECTROTHÉRAPIE DES HOPITAUX
ASSISTANT A LA CLINIQUE DES MALADIES DES VOIES URINAIRES DE L'HOPITAL GÉNÉRAL
LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Examinateurs de la Thèse (*Assesseurs*)

IMBERT, Professeur, *Président.*
VILLE, Professeur.
GRYNFELTT, Agrégé.
LISBONNE, Agrégé.

MONTPELLIER
IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE
Rue Ferdinand-Fabre et Quai du Verdanson.

1914

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Administration

MM. MAIRET (✲). . . . . DOYEN
SARDA. . . . . ASSESSEUR
IZARD. . . . . SECRÉTAIRE

Professeurs

Clinique chirurgicale	MM. TEDENAT (✲).
Clinique médicale	CARRIEU.
Clinique des maladies mentales et nerv.	MAIRET (✲).
Physique médicale	IMBERT (✲).
Botanique et hist. nat. méd	GRANEL.
Clinique chirurgicale	FORGUE (✲)
Clinique ophtalmologique.	TRUC (O. ✲).
Chimie médicale.	VILLE.
Physiologie	HEDON.
Histologie	VIALLETON.
Pathologie interne.	DUCAMP.
Anatomie	GILIS (✲).
Clinique chirurgicale infantile et orthop.	ESTOR.
Microbiologie	RODET.
Médecine légale et toxicologie	SARDA.
Clinique des maladies des enfants	BAUMEL (✲).
Pathologie et thérapeutique générales . .	BOSC.
Hygiène	BERTIN-SANS (H.)
Clinique médicale.	RAUZIER (✲).
Clinique obstétricale	VALLOIS.
Thérapeutique et matière médicale. . . .	VIRES.
Anatomie pathologique	N...

Professeurs adjoints : MM. DE ROUVILLE, PUECH, MOURET
Doyen honoraire : M. VIALLETON
Prof. hon.: MM. E. BERTIN-SANS (✲), HAMELIN (✲), GRASSET (O ✲)
Secrétaire honoraire : M. GOT

Chargés des Cours Complémentaires

Clinique gynécologique.	MM. DE ROUVILLE, (prof. adj.
Accouchements.	PUECH, prof. adj.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie . .	MOURET, prof. adj.
Pathologie externe	LAPEYRE, a. l. (ch de c.)
Clinique des malad. des voies urinaires.	JEANBRAU (✲), a. l. (ch de c.
Clinique ann. des mal. syphil. et cutan.	VEDEL, agr. l. (ch. de c.)
Médecine opératoire.	SOUBEYRAN, a. l. (c. c.
Clinique annexe des mal. des vieillards.	EUZIERE, agrégé.
Accouchements.	P. DELMAS, agrégé.

Agrégés en exercice

MM. GALAVIELLE	MM. RICHE	MM. J. DELMAS
GRYNFELTT	CABANNES	RIMBAUD
LAGRIFFOUL	DERRIEN	ROGER
LEENHARDT	P. DELMAS	ETIENNE
GAUSSEL	MASSABUAU	LISBONNE
	EUZIERE	

Examinateurs de la Thèse

MM. IMBERT, *professeur, présid.* | MM. GRYNFELTT, *agrégé.*
VILLE, *professeur.* | LISBONNE, *agrégé.*

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur; qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MES AMIS

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

En témoignage de reconnaissance et de profonde affection.

P. SANGOUARD.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR IMBERT

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

En hommage très respectueux et en reconnaissance de son précieux enseignement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VILLE

Très respectueux hommage de profonde gratitude pour l'honneur qu'il veut bien nous faire aujourd'hui en acceptant de faire partie du jury de notre thèse.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ GRYNFELTT

Avec l'expression de notre très vive gratitude.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ LISBONNE

En souvenir des années passées au laboratoire de physiologie.

P. SANGOUARD.

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

EXTERNAT

MONSIEUR LE PROFESSEUR ESTOR.
MONSIEUR LE PROFESSEUR FORGUE.
MONSIEUR LE PROFESSEUR DE ROUVILLE.
MONSIEUR LE PROFESSEUR RAUZIER.
MONSIEUR LE PROFESSEUR TÉDENAT.
MONSIEUR LE PROFESSEUR VALLOIS.

SERVICE DES MALADIES DES VOIES URINAIRES

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JEANBRAU

A MES MAITRES DANS LES LABORATOIRES

MONSIEUR LE PROFESSEUR IMBERT.
MONSIEUR LE PROFESSEUR VILLE.
MONSIEUR LE PROFESSEUR HÉDON.

A L'AMI REGRETTÉ G. FLEIG

CHARGÉ DU COURS D'AGRÉGATION DE PHYSIOLOGIE A LA FACULTÉ

A MES MAITRES DE CONFÉRENCES

MONSIEUR LE FROFESSEUR AGRÉGÉ GAUSSEL.
MONSIÉUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ RICHE.
MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ LEENHARDT.
MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ROGER.

P. SANGOUARD.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JEANBRAU

CHIRURGIEN CHEF DU SERVICE DES MALADIES DES VOIES URINAIRES
DE L'HOPITAL GÉNÉRAL
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

En témoignage de ma grande admiration pour son brillant enseignement et en hommage de profonde gratitude pour l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter au cours de nos études.

P. SANGOUARD.

RECHERCHES

SUR

LA RÉACTION A LA PHÉNOLPHTALINE

SA SENSIBILISATION

ET SUR

LA RÉACTION A LA FLUORESCINE

POUR LA RECHERCHE DU SANG DANS L'URINE

ET DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES

(Déductions et applications cliniques)

INTRODUCTION

Parmi les réactions colorées du sang basées sur le pouvoir oxydant de ce dernier, une des plus en vogue aujourd'hui et des mieux étudiées est celle de Kastle-Meyer, qui utilise la phénolphtaline en milieu alcalin, celle-ci donnant, au contact du sang et de l'eau oxygénée, une coloration rouge violacé ou rouge fuchsine par formation de phénolphtaléine.

Tout récemment, cette réaction, dont la sensibilité est déjà élevée, a été l'objet d'une modification augmentant encore de beaucoup sa sensibilité et qui consiste, comme l'a trouvé Telmon, à additionner d'alcool acétique le liquide, en l'espèce l'urine, où l'on recherche le sang, avant d'effectuer la réaction de Meyer proprement dite.

Ayant eu l'occasion, à maintes reprises, d'employer la

réaction de Meyer, modifiée ou non, pour la recherche du sang dans l'urine ou dans divers liquides organiques de plusieurs malades du service des maladies des voies urinaires du professeur Jeanbrau et de la clinique médicale du professeur Rauzier, nous avons été amené à entreprendre l'étude détaillée de cette réaction et à comparer avec elle, au cours de ces recherches, une réaction à la fluorescine, trouvée récemment par notre ami regretté Fleig, qui est aussi d'une très grande sensibilité.

Les deux réactions, à la phénolphtaline et à la fluorescine, font le sujet du présent travail, appliquées à la recherche du sang à la fois dans l'urine et dans divers liquides organiques, d'origine humaine ou animale.

Ce travail est divisé de la façon suivante :

Dans la *première partie* se trouvent résumées les principales données actuellement acquises sur la recherche du sang, dans l'urine principalement, par la réaction de Meyer et la réaction de Meyer modifiée par Telmon.

Dans la *deuxième partie* sont groupées les recherches que nous avons faites sur la réaction de Meyer originelle ou modifiée appliquée aux dilutions hématiques, aqueuses ou urinaires (en particulier, en ce qui concerne diverses urines pathologiques, purulentes et autres) et plus spécialement sur le mécanisme de l'action sensibilisante de l'alcool acétique vis-à-vis de la réaction de Meyer. De ces recherches découlent diverses modifications perfectionnant encore la réaction de Meyer au point de vue pratique et diverses données d'ordre biologique permettant de comparer l'activité peroxydasique (vis-à-vis de la réaction de Meyer) du fer hématique suivant la complexité de sa combinaison moléculaire.

La *troisième partie* étudie la réaction du sang à la fluorescine au point de vue théorique et au point de vue clini-

que et montre les différences qu'elle présente avec la réaction à la phénolphtaline.

La *quatrième partie* a trait à la recherche du sang dans les milieux organiques autres que l'urine par la réaction de Meyer, sensibilisée ou non, et par la réaction à la fluorescine.

Qu'il nous soit permis d'assurer MM. les professeurs Jeanbrau, Rauzier et Ville de notre respectueuse gratitude pour l'obligeance avec laquelle ils ont bien voulu mettre à notre disposition les ressources de leurs laboratoires et de leurs cliniques. Leurs conseils éclairés nous ont permis de mener à bien le présent travail. Notre reconnaissance va aussi tout spécialement à notre regretté ami, le docteur Fleig, chargé du cours d'agrégation de physiologie à la Faculté de médecine, qui nous a donné l'idée de ces recherches et qui, par ses travaux et les conseils précieux donnés pendant les quatre années passées au laboratoire de physiologie, où nous avons été son collaborateur attentif, nous a permis de poursuivre nos recherches.

PREMIÈRE PARTIE

PRINCIPALES DONNEES ACTUELLEMENT ACQUISES SUR LA REACTION DE MEYER POUR LA RECHERCHE DU SANG DANS L'URINE ET SUR LES MODIFICATIONS DE CETTE REACTION

On sait que la réaction de Meyer est due à la propriété péroxydasique de la matière colorante du globule rouge. Sous l'influence de cette propriété, l'eau oxygénée est ainsi décomposée :

$$H^2O^2 = H^2O + O$$

Il faut bien distinguer la propriété peroxydasique de la propriété oxydasique (ferments oxydants directs prenant l'oxygène de l'atmosphère et le cédant ensuite sous forme d'oxygène actif) et de la propriété catalasique, celle-ci donnant naissance à de l'oxygène inactif sous forme moléculaire O^2 :

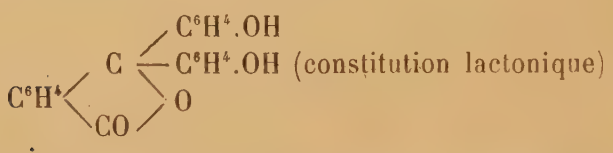
$$2H^2O^2 = 2H^2O + O^2$$

La propriété peroxydasique de la matière colorante du globule rouge n'est pas d'ordre diastasique, car elle n'est pas détruite par la chaleur, à l'inverse de diverses peroxy-

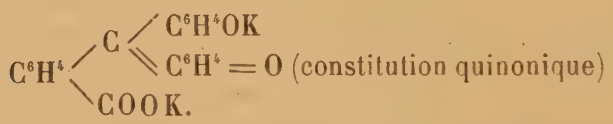
dases d'ordre diastasique, telles que celles du pus, de la salive, de certains aliments, etc... A côté de la peroxydase de la matière colorante du globule rouge, il existe aussi des peroxydases non diastasiques *minérales* (hydrate ferrique, hydrate cuivrique, à l'état colloïdal) qui sont capables aussi de donner la réaction de Meyer.

Il est intéressant de constater que la substance péroxydante des hématies doit sa propriété au fer, du groupement hématine (ou plutôt hématinogène) de l'hémoglobine, ce qui la rapproche au point de vue théorique des peroxydases minérales.

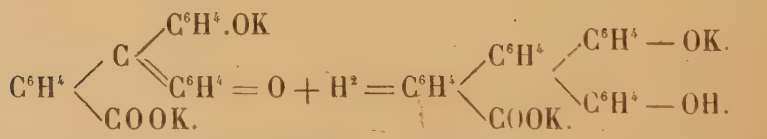
La phénolphtaléine incolore



qui, on le sait, donne un sel rouge en solution alcaline,



se réduit, en milieu alcalin, à l'état de phénolphtaline incolore, selon la réaction qui suit:

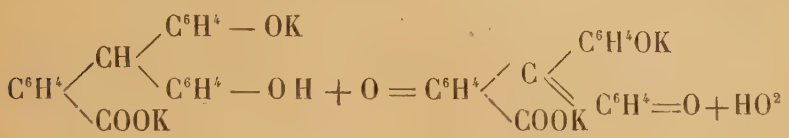


Sel potassique de la phénolphtaléine rouge ou *aci-phénolphtaléine di-potassique*

Phénolphtaline à l'état de sel, incolore ou *aci-phénolphtaline di-potassique*

Pratiquement, on opère cette réduction par de la poudre de zinc, qui, au contact de la potasse, donne le dégagement d'hydrogène réducteur.

La phénolphtaline (sel), une fois réduite, se transforme à nouveau en phénolphtaléine (sel), sous l'influence de la peroxydase hématique :



Aci-phénolphtaline di-potassique. Aci-phénolphtaléine di-potassique.

Quant au réactif de Meyer, il se prépare de la façon suivante :

On porte à l'ébullition dans un ballon :

2 grammes de phénolphtaléine,
20 grammes de potasse caustique dissous dans
100 grammes d'eau distillée, et on y ajoute
10 grammes de poudre de zinc impalpable.

Le mélange se décolore peu à peu et on obtient finalement un liquide qui, filtré chaud, ne présente qu'une très légère teinte jaunâtre ; on le conserve en flacons bien bouchés.

La recherche du sang dans l'urine, par la réaction de Meyer originelle, est d'une extrême simplicité. On verse successivement dans un tube à essai :

2 cc. d'urine,
1 cc. de réactif et, après agitation,
IV à V gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes.

Si l'urine contient du sang, on obtient, suivant la proportion de ce dernier, une coloration allant du rose violacé au rouge cerise ou au rouge fuchsine.

D'après Triboulet, on pourrait déceler ainsi dans l'urine une proportion de sang de 1 p. 10.000 et quelquefois de 1 p. 20.000 ; certains auteurs même attribuent à la réaction une sensibilité bien plus grande encore (1 p. 100.000 ?)

On sait, d'ailleurs, que la sensibilité de la réaction effectuée dans l'eau est bien plus élevée encore que celle de la même réaction effectuée dans l'urine (1 p. 1.000.000?). Telmon et Sardou ont bien insisté sur le fait de la grande perte de sensibilité de la réaction dans l'urine et ont noté que « la sensibilité paraît même diminuer d'autant plus que l'urine est plus chargée, plus dense ». Ils ont constaté fréquemment des réactions négatives, même avec des urines où le microscope montrait « des globules rouges en certain nombre », alors que certaines autres, de faible densité, donnaient déjà une réaction positive avec de rares globules.

Nous ferons remarquer, dès maintenant, que, dans les urines très denses, montrant au microscope des globules rouges en nombre appréciable, on peut néanmoins obtenir une réaction nettement positive si l'on opère la réaction sur le culot de centrifugation urinaire mis en suspension, soit dans un centimètre cube de l'urine en nature, soit dans un centimètre cube de la même urine diluée de 1 *ou de* 2 *volumes d'eau distillée.*

L'urine renfermant donc certains éléments pouvant gêner la réaction au point de l'empêcher de se produire, Telmon a cherché à tourner cette difficulté et y est parvenu très heureusement en opérant de la façon suivante.

Les réactifs nécessaires sont:

1° Le réactif de Meyer;

2° De l'alcool acétique { Acide acétique crist. . . . . 2 cc. / Alcool à 90°. . . . . 98 cc.

3° De l'eau oxygénée à 12 volumes.

On verse dans un tube à essai, successivement:

3 cc. d'urine non filtrée, préalablement homogénéisée,
3 cc. d'alcool acétique, et on agite,
1 cc. de réactif de Meyer, et on agite,
III gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes.

Il se produit une coloration allant du rose violacé au rouge fuchsine, suivant la quantité de sang dans l'urine.

La réaction est extrêmement sensible, donne un résultat positif pour beaucoup d'urines ne donnant pas la réaction de Meyer originelle; son début en est très rapide et, toutes choses égales d'ailleurs, la coloration obtenue est beaucoup plus stable que dans le cas de la réaction de Meyer simple. D'après Sardou, la réaction ne serait applicable qu'à l'urine.

Mais des épreuves témoins, faites avec de l'eau distillée ne contenant pas de sang, au lieu d'urine hématique, ont montré à Telmon et à Sardou que l'alcool acétique, employé dans la modification de Telmon, est capable de donner déjà par lui-même, avec le réactif de Meyer, une certaine coloration rose.

Néanmoins, Sardou conclut que l'urine, même diluée d'eau distillée dans la proportion de 1 cc. d'urine et de 9 cc. d'eau, contient des substances empêchant l'alcool acétique de donner par lui seul la réaction.

Nous verrons plus loin les restrictions qu'il y a lieu de faire à ce point de vue en ce qui concerne les urines polyuriques et les précautions à prendre lorsqu'on veut leur appliquer la réaction de Meyer modifiée par Telmon.

Sardou a cherché quelles pouvaient être, dans l'urine normale, les substances qui diminuaient la sensibilité de la réaction de Meyer. Les corps qu'il a examinés à ce point de vue, urée, acide urique, NaCl, phosphates, créatinine, acide hippurique, se sont montrés sans action. Il rappelle seulement que les substances urinaires précipitables par les sels de plomb, ainsi que l'a montré Maillard, et notamment les matières colorantes jaune orangé et brunes entravent les réactions de l'indoxyle. Peut-être alors s'agirait-il ici aussi d'une action de ces mêmes substances.

La sensibilité de la réaction de Meyer modifiée par Telmon serait telle qu'elle permettrait de déceler dans de l'urine 1 p. 500.000 de sang et même davantage. Pour les urines chargées, à précipité abondant et un peu coloré, il serait bon d'opérer en n'ajoutant l'eau oxygénée qu'après filtration du mélange homogénéisé d'urine, d'alcool acétique et de réactif de Meyer.

Quant au mode d'action de l'alcool acétique, Telmon et Sardou pensent que l'alcool favoriserait l'hémolyse et l'oxydation, et Sardou ajoute que l'acide acétique *amorcerait* l'oxydation et faciliterait l'apparition de la réaction colorée. C'est tout ce que les auteurs indiquent à ce sujet.

L'albumine, les pigments biliaires, l'urobiline, la glucose, l'acide urique, les phosphates, l'indican, l'acétone, l'antipyrine, les iodures, les bromures, l'acide salicylique, le phénol (contenus dans l'urine normalement, pathologiquement ou médicamenteusement) ne donnent pas la réaction de Meyer.

Quant au *pus urinaire*, d'après Delearde et Benoît, ainsi que d'après Puy-le-Blanc, il serait sans action sur le réactif de Meyer. Pour Pozzi-Escot et Willenz, il aurait au contraire une action.

A priori il est bien certain, en ce qui concerne le pus urinaire, qu'on ne peut formuler aucune règle fixe : anatomo-pathologiquement, le pus doit toujours contenir quelques globules rouges (détruits ou non) et souvent il en contient beaucoup, par suite de la diapédèse des hématies entraînées passivement par les leucocytes. On comprend donc que, suivant la provenance du pus urinaire et suivant la densité plus ou moins grande de l'urine, on puisse avoir, pour ne considérer que les globules rouges du pus,

un résultat positif ou négatif avec la réaction de Meyer (avec ou sans alcool acétique).

De plus, les globules *blancs* du pus peuvent contenir aussi un ferment oxydant (en plus ou moins grande quantité d'ailleurs, suivant l'état de dégénérescence des leucocytes) capable d'oxyder le réactif de Meyer. Enfin, la possibilité de peroxydases bactériennes dans le pus doit aussi entrer en ligne de compte. Dans ces conditions, si une urine purulente donne la réaction de Meyer, il faut la chauffer à l'ébullition pour détruire les peroxydases d'origine leucocytaire ou microbienne et refaire la réaction sur cette urine chauffée et refroidie ensuite. Il ne peut persister alors que l'action peroxydasique provenant des globules rouges.

Telles sont les principales données actuellement acquises sur la recherche du sang dans l'urine par la réaction à la phénolphtaline.

Nous allons maintenant exposer nos recherches personnelles sur le sujet et grouper les principaux faits qui nous paraissent ressortir de cette étude.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LA REACTION DE MEYER DANS L'URINE, LES DILUTIONS AQUEUSES DE SANG, D'HEMOGLOBINE ET D'HEMATINE ET SUR LES MODIFICATIONS DE CETTE REACTION. APPLICATIONS CLINIQUES

I. — De quelques agents autres que le sang pouvant oxyder le réactif de Meyer

Nous avons rappelé plus haut que le sang n'est pas le seul agent pouvant oxyder le réactif de Meyer et cité à ce propos l'*hydrate ferrique colloïdal* et l'*hydrate cuivrique*. Citons encore le *fer réduit*, le *formol*, agissant aussi en présence d'eau oxygénée, et le *permanganate* de potasse qui, en solution extrêmement étendue, oxyde aussi le réactif de Meyer, même sans eau oxygénée.

Nous avons constaté que l'oxydation du réactif était extrêmement intense avec des solutions de *ferro-cyanure* et de *ferri-cyanure* de potassium même très fortement diluées, et cela sans addition d'eau oxygénée.

Le *sulfate de cuivre,* on le savait déjà, est capable encore d'oxyder la phénolphtaline et nous avons observé que cette oxydation constituait une réaction d'une extrême sensibilité, capable de mettre en évidence la présence d'un sel cuivrique dans des solutions aqueuses extraordinairement diluées (plusieurs millionièmes). Cette réaction, bien que non spécifique du cuivre, nous paraît être d'un grand intérêt, étant données ses limites de sensibilité.

Pour des solutions, même très étendues de sulfate de cuivre, ne donnant absolument aucune coloration avec le ferro-cyanure de potassium, qui est lui-même déjà très sensible pour déceler les sels de suivre, on obtient, avec le réactif de Meyer, sans ou avec eau oxygénée, suivant le taux de la dilution cuivrique, soit à froid, soit à l'ébullition, des colorations rouge fuchsine très intenses.

Si, par exemple, à 10 cc. d'une solution de sulfate de cuivre à des dilutions allant de 1 p. 1.000.000 à 1 p. 5.000.000 on ajoute 2 cc. de réactif de Meyer, on peut déjà obtenir une coloration rouge violacé intense par addition de quelques gouttes d'eau oxygénée à froid ou à chaud. La même réaction, effectuée sur une eau distillée sur alambic de cuivre, donne encore une légère teinte rose; sur l'eau de la ville, recueillie au robinet du laboratoire, la teinte obtenue est déjà nettement plus faible, et, sur une eau distillée dans une cornue de verre, on n'obtient plus aucune coloration.

Ces faits appuient d'une preuve chimique la constatation d'ordre biologique que certaines eaux distillées sur alambic de cuivre manifestent des propriétés toxiques si elles sont employées à la préparation de milieux de culture pour certains éléments végétaux sensibles à l'action du cuivre et sont moins aptes à la préparation du plasma de

Quinton (eau de mer diluée de 3/4 d'eau distillée) que les eaux distillées sur appareils en verre.

L'extrême sensibilité de la réaction au sulfate de cuivre, avec le réactif de Meyer, nous permet déjà de juger par analogie que l'oxydation du même réactif par le fer de l'hémoglobine pourra constituer aussi une réaction fort sensible.

L'*acide azotique* (IV gouttes dans 3 cc. d'eau) n'oxyde pas le réactif de Meyer; il en est de même pour le *bichromate* de potasse, le *chlorate* de potasse, les *sels ferriques*, le *méta-vanadate* de soude, les mélanges de chlorate et de méta-vanadate.

La réaction de Meyer nous paraît donc constituer une réaction bien supérieure aux réactions colorées du sang généralement employées et jouir d'une spécificité nettement plus marquée que dans le cas des précédentes. Cependant elle est loin d'être spécifique au sens absolu du mot, puisque certaines substances (à part les peroxydases leucocytaires ou bactériennes) d'ordre minéral la donnent aussi.

Mais, pratiquement, il est bien rare que ces substances se trouvent dans les milieux où l'on a à rechercher le sang, en particulier dans l'urine. Dans le cas de cette dernière notamment, si une substance éliminée, à la suite de son introduction médicamenteuse dans l'organisme, était susceptible de donner la réaction, *il serait facile, par des épreuves témoins ou par la dialyse de l'urine, de dissocier* la part qui lui revient dans l'oxydation du réactif et la part qui revient au sang.

Ces faits nous font comprendre déjà tout l'intérêt qui s'attache à l'étude détaillée de la réaction de Meyer et des moyens permettant de la sensibiliser.

Ajoutons que les deux antiseptiques les plus habituelle-

ment employés pour la conservation de l'urine, le *thymol* et le *cyanure de mercure,* ne gênent nullement la réaction et sont eux-mêmes sans effet sur le réactif de Meyer.

II. — Réaction de Meyer originelle ou modifiée (par addition d'alcool acétique) sur des dilutions sanguines aqueuses et sur des urines de diverse nature. — Sensibilité.

1° Dilutions sanguines aqueuses

La limite de sensibilité de la réaction de Meyer originelle dans des dilutions aqueuses de sang est environ de 1/1.000.000. D'après nos expériences, la limite de sensibilité de la réaction de Meyer, modifiée par addition d'alcool acétique, bien que paraissant d'abord plus grande que dans le cas de la précédente réaction, n'est, en réalité, que peu au-delà : la réaction sensibilisée donne évidemment un résultat positif sur des dilutions sanguines plus élevées que celles où cesse de donner la réaction de Meyer originelle, mais les colorations obtenues alors sont extrêmement faibles et tout à fait comparables à celle que donne la simple eau distillée (réactions avec l'eau distillée que nous appellerons, pour simplifier le langage, « *réactions à blanc* »). Dans ces conditions, il est difficile d'établir, étant données les faibles teintes obtenues, dans quelles limites exactement la réaction de Meyer à l'alcool acétique est plus sensible que la réaction de Meyer originelle.

Pratiquement, nous concluons que, *pour des dilutions de sang dans l'eau, l'alcool acétique n'augmente que relativement peu la sensibilité de la réaction de Meyer originelle.*

2° Urines diverses, à éléments anormaux, médicamenteux ou pathologiques. — Sensibilité comparée dans les diverses urines et dans l'eau.

Mais il en est bien autrement si l'on compare la sensibilité de la réaction de Meyer originelle et de la même à l'alcool acétique dans l'urine, au lieu de la comparer dans l'eau. Nous avons vu que, d'une façon générale, plus l'urine était dense, plus la sensibilité de la réaction de Meyer y était diminuée. Cette diminution de sensibilité n'est pas due aux éléments anormaux d'urines pathologiques ou d'urines contenant des principes provenant d'une élimination médicamenteuse: l'urine normale, de densité normale, la provoque nettement. Or, *l'addition d'alcool acétique à l'urine sensibilise la réaction de Meyer dans cette urine au point de la rendre à peu près aussi sensible que dans l'eau distillée.*

C'est ce dont nous nous sommes rendu compte dans de nombreuses expériences où nous avons comparé la sensibilité de la réaction de Meyer originelle et de sa modification à l'alcool acétique dans des urines de dilution sanguine de plus en plus forte.

La diminution de sensibilité de la réaction de Meyer par la présence de l'urine étant extrêmement marquée, il était intéressant de chercher à élucider quels pouvaient être, dans l'urine, les corps auxquels elle était due. C'est ce que nous allons examiner.

3° Recherche des composés urinaires diminuant la sensibilité de la réaction de Meyer

Nous avons signalé plus haut que divers constituants de l'urine normale, essayés séparément par Sardou pour

la recherche de l'action empêchante de l'urine vis-à-vis de la réaction de Meyer, n'avaient donné que des résultats négatifs et que l'action empêchante pourrait être due aux matières colorantes de l'urine.

Nous nous sommes demandé, en conséquence, si une urine, déféquée à l'*acétate de plomb*, filtrée, additionnée ensuite de carbonate de soude et filtrée à nouveau, jouissait du même pouvoir empêchant : dans une telle urine, ce pouvoir est nettement diminué. Malheureusement, les manipulations nécessaires à la défécation séparent le sang (hémoglobine ou globules rouges) de l'urine, de sorte que la réaction de Meyer ne peut plus s'effectuer sur cette urine.

De même, la décoloration de l'urine par le *noir animal* sépare aussi l'hémoglobine dissoute dans l'urine, de sorte que ce traitement préalable n'est pas à utiliser (du moins lorsque l'urine ne contient pas de très grandes quantités de sang).

En ce qui concerne la recherche proprement dite des composés urinaires empêchant la réaction de Meyer, nous avons fait les recherches suivantes.

Nous avons d'abord examiné l'action de l'urine normale *décolorée par le noir animal.*

Voici, par exemple, *deux réactions effectuées sur l'eau distillée, comparativement, avec et sans addition d'urine normale décolorée par le noir animal:*

Eau distillée	3 cc.	Coloration *rose* nette de la « *réaction à blanc.* »
Alcool acétique	3 cc.	
Réactif de Meyer	1 cc.	
H^2O^2	VI gouttes	
Urine normale D = 1025 décolorée par le noir animal	3 cc.	Pas de coloration, c'est-à-dire *suppression de la «réaction à blanc»*
Alcool acétique	3 cc.	
Réactif de Meyer.	1 cc	
H^2O^2	VI gouttes	

L'urine décolorée par le noir animal contient donc encore des substances empêchantes vis-à-vis des « réactions à blanc » de l'alcool acétique sur le réactif de Meyer. Nous avons constaté aussi que la recherche du sang introduit artificiellement dans une telle urine, faite selon la réaction de Meyer originelle, est aussi bien moins sensible que dans le cas d'une recherche faite sur des dilutions *aqueuses* de sang.

L'action empêchante de l'urine décolorée au noir animal se manifeste aussi, si, au lieu d'effectuer la réaction de Meyer-Telmon sur l'eau distillée, on l'effectue sur une urine fortement polyurique, ainsi que le montrent les deux réactions qui suivent:

Urine polyurique de D = 1001 (ne contenant pas de sang).	3 cc.	Légère coloration rose « réaction à blanc. »
Alcool acétique.....	3 cc.	
Réaction de Meyer.....	1 cc.	
H^2O^2.....	IV gouttes	
Même urine polyurique	3 cc.	Pas de coloration (pas de réaction à blanc).
Urine normale D = 1026 décolorée au noir animal.....	3 cc.	
Alcool acétique.....	3 cc.	
Réaction de Meyer.....	1 cc.	
H^2O^2.....	VI gouttes	

Aucun des constituants de l'urine pris isolément n'ayant manifesté de pouvoir empêchant net (urée, acide urique, acide hippurique, créatine, créatinine, xanthine, sels urinaires, cystine [1]), nous avons essayé de réaliser une *urine artificielle* contenant les principales de ces substances afin de voir si, agissant ensemble, elles ne seraient pas pourvues d'un certain pouvoir empêchant. La consti-

(1) Cystine cristallisée préparée du crin de cheval.

tution de cette urine artificielle *schématique* répondait à la formule suivante :

Urée	25 grammes.
Acide urique	0 gr. 5
— hippurique	0 gr. 5
Créatine	0 gr. 6
Créatinine	0 gr. 6
PO^4HNa^2	2 grammes
SO^4Na^2	1 gr. 5
NaCl	12 gr.
$(PO^4)^2CaH^4$	1 gr.
Eau distillée q. s. pour	1000 cc.

Ce mélange ne s'est montré que très faiblement doué du pouvoir empêchant vis-à-vis des « réactions à blanc » effectuées entre l'alcool acétique et le réactif de Meyer. Voici, par exemple, deux des réactions obtenues :

Eau distillée	6 cc.	Coloration rose.
Alcool acétique	3 cc.	
Réactif Meyer	1 cc.	
H^2O^2	VI gouttes	

Eau distillée	3 cc.	La coloration rose n'apparaît qu'au bout de 10 à 15 minutes et n'est pas aussi marquée que la précédente.
Urine artificielle	3 cc.	
Alcool acétique	3 cc.	
Réactif Meyer	1 cc.	
H^2O^2	VI gouttes	

En réalisant une urine artificielle plus concentrée que la précédente, notamment en urée (15 0/0 d'urée), on ne constate pas de pouvoir empêchant plus intense.

Les divers corps entrant dans la constitution de l'urine artificielle schématique dont la formule précède ne peuvent expliquer que tout à fait partiellement le pouvoir empêchant de l'urine vis-à-vis de la réaction de Meyer.

De l'*indican* retiré de l'urine a manifesté par contre un pouvoir empêchant assez marqué. Mais nous n'osons tirer aucune conclusion de cette constatation, le produit utilisé n'ayant pas présenté des caractères de pureté suffisants.

L'*urine normale, concentrée par évaporation au bain-marie,* manifeste un pouvoir empêchant très marqué. On réduit, par exemple, au bain-marie 275 cc. d'urine de D = 1026 à un volume de 75 cc.

Ces 75 cc. sont divisés en DEUX volumes égaux, l'*un,* A, dont on décolore une partie au noir animal (décoloration très imparfaite) et dont on conserve l'autre partie en nature, l'*autre,* B, qu'on continue à évaporer, et dont on traite ensuite le résidu par 50 cc. d'alcool à 95° ; cet extrait alcoolique est fortement coloré ; le précipité laissé par l'alcool sur le résidu est traité par l'eau à l'ébullition et filtré (liquide fortement coloré).

L'extrait alcoolique lui-même est conservé, une partie en nature, l'autre partie après décoloration au noir animal (décoloration imparfaite).

Tous ces liquides possèdent le pouvoir empêchant, sauf le liquide provenant du traitement par l'eau du précipité.

De cet ensemble de recherches, nous croyons pouvoir conclure que *ce sont non seulement les matières colorantes de l'urine qui possèdent un pouvoir empêchant vis-à-vis de la réaction de Meyer, mais aussi d'autres substances urinaires, à la fois des corps solubles dans l'eau et des corps solubles dans l'alcool.*

4° Urines polyuriques. Utilisation de l'action empêchante de l'urine normale pour supprimer les « réactions à blanc » dans les urines polyuriques ne contenant pas de sang.

Nous avons déjà mentionné que les urines fortement polyuriques ne contenant pas de sang donnent néanmoins,

sous l'influence de l'alcool acétique, une certaine coloration par le réactif de Meyer, en raison de la forte diminution des substances urinaires empêchant les « réactions à blanc », alors que la réaction de Meyer originelle est parfaitement négative.

Un excès de potasse n'empêche nullement cette réaction à blanc, pas plus que l'addition de quelques gouttes d'ammoniaque.

Mais il est facile d'éviter les causes d'erreur provenant de la très faible densité de l'urine, en ajoutant, à cette urine, un égal volume d'urine de densité normale (de D = 1020 à 1026 et au-dessus) préalablement vérifiée comme ne donnant aucune réaction avec le réactif de Meyer en présence d'alcool acétique. Nous avons cité plus haut deux réactions comparatives, effectuées dans ces conditions, sur des urines polyuriques de D = 1001.

Donc, pratiquement, lorsqu'on aura à rechercher du sang dans des urines de densité au-dessous de 1010, il faudra, si l'on opère en présence d'alcool acétique, ramener l'urine à une densité normale en lui ajoutant une proportion convenable d'urine normale, plutôt de forte densité, ou d'un des extraits urinaires précédemment indiqués et conservés. L'extrait alcoolique nous a paru très approprié à ce point de vue.

Nous avons même essayé, pour simplifier les opérations au moment de la recherche du sang dans l'urine, de préparer un réactif de Meyer avec, au lieu de 100 cc. d'eau distillée, parties égales d'eau distillée et d'urine de D = 1026 décolorée au noir animal.

A cet effet, on fait le mélange suivant:

Phénolphtaléine.....	4 grammes
Koff.....	40 grammes
Eau distillée.....	100 cc.
Poudre de zinc	20 grammes

En filtrant à chaud après ébullition, on obtient 100 cc. de liquide qu'on divise en *deux lots* de 50 cc. Le *premier lot* de 50 cc. est additionné de 50 cc. d'eau distillée, ce qui constitue le *réactif de Meyer originel*. Le *deuxième lot* de 50 cc. est additionné de 50 cc. d'urine de D = 1026, décolorée au noir animal (addition faite à froid). On filtre pour séparer le précipité alcalino-terreux urinaire et on obtient ainsi un second réactif ne différant du Meyer originel que parce qu'il contient une notable proportion d'urine normale. C'est ce réactif que nous avons comparé au précédent (témoin) pour divers essais. En particulier, sur des dilutions sanguines urinaires et sur l'eau distillée.

Le réactif de Meyer à urine décolorée donne, en présence d'alcool acétique, sur des dilutions de sang dans une urine normale, des réactions un peu moins intenses que le réactif de Meyer originel. Sur des urines polyuriques, ne contenant pas de sang, il ne donne absolument aucune réaction, alors que le réactif de Meyer originel (toujours en présence d'alcool acétique) donne des colorations rose lilas très nettes. Mêmes résultats en opérant sur de l'eau distillée au lieu d'urine polyurique.

Mais nous devons ajouter que le réactif de Meyer, à urine décolorée, perd, avec le temps, peu à peu de son pouvoir empêchant vis-à-vis des réactions à blanc de l'alcool acétique, ce qui diminue son avantage au point de vue pratique.

Au total, il nous paraît plus simple, dans le cas d'urine polyurique, d'additionner celle-ci d'urine normale ou d'extrait urinaire conservé, pour se mettre à l'abri des causes d'erreurs dues aux « réactions à blanc ».

5° Urines purulentes. — Dissociation de l'action peroxydasique hémoglobinique et des actions peroxydasiques leucocytaires ou sériques possibles.

Nous avons, sur cinq malades de la clinique du professeur Jeanbrau, présentant des urines purulentes dues à des lésions diverses de l'appareil urinaire, effectué la recherche du sang dans l'urine à la fois par la réaction de Meyer et par la même réaction en présence d'alcool acétique, avant et après chauffage de l'urine.

Sur les urines *non chauffées et non cyanurées, mais examinées de suite après leur émission,* la réaction de Meyer originelle a été tantôt faiblement positive, tantôt absolument négative.

Sur les mêmes urines non cyanurées et examinées plusieurs jours après l'émission, la réaction de Meyer a été plus souvent et plus fortement positive.

Sur les premières, après chauffage, la réaction de Meyer a toujours été moins intense qu'avant chauffage et quelquefois négative, alors qu'elle était positive avant le chauffage.

Sur ces diverses urines, la réaction de Meyer, en présence d'acide acétique, a toujours été plus intense que la réaction de Meyer originelle et a toujours été positive soit avant chauffage, soit après chauffage, mais moins intense après chauffage qu'avant chauffage.

Ces divers faits confirment bien les conclusions rapportées au début de ce travail et d'après lesquelles le pus urinaire a une action peroxydasique complexe due, d'une part, aux globules rouges *qu'il peut contenir en plus ou moins grande quantité (peroxydase non détruite par la chaleur), d'autre part, aux* leucocytes *ou au* sérum (*pe-*

roxydase détruite par la chaleur et d'autant plus abondante que les leucocytes sont plus dégénérés); d'autre part enfin, aux microbes (*peroxydase détruite par la chaleur et d'autant plus abondante que l'urine est conservée sans antiseptique et depuis plus longtemps*).

Il ne faut cependant pas se méprendre sur l'action du chauffage: bien que celui-ci ne détruise pas à proprement parler la propriété peroxydasique du globule rouge, de l'hémoglobine ou de l'hématine, *il l'atténue* cependant dans une certaine mesure et, comme nous le verrons, le seul fait du chauffage de solutions sanguines, hémoglobiniques ou hématiniques, aqueuses ou urinaires, diminue leur sensibilité à la réaction de Meyer. *C'est dire que, pour des urines contenant extrêmement peu de sang, le chauffage pourra complètement empêcher la réaction de Meyer* (*en présence d'alcool acétique ou non*), *fait au sujet duquel il est utile d'être averti pour l'interprétation des résultats.*

III. — Mécanisme de l'action sensibilisante de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer

On a vu que, d'après Telmon et Sardou, l'alcool acétique agirait de la façon suivante pour sensibiliser la réaction de Meyer: l'alcool favoriserait l'hémolyse et l'oxydation, l'acide acétique amorcerait l'oxydation et faciliterait l'apparition de la réaction.

Nous avons étudié, au moyen d'une analyse très détaillée, quels pouvaient être exactement les facteurs intervenant dans le mode d'action de l'alcool acétique. On pouvait rechercher d'abord si l'alcool agissait bien en favorisant l'hémolyse.

1° L'action sensibilisante est-elle en rapport avec une augmentation d'hémolyse ?

A priori, il était bien peu probable que l'alcool acétique pût agir en augmentant l'hémolyse du sang en suspension dans l'urine, car, dans la façon dont on effectue la réaction de Meyer originelle, on fait agir d'abord le réactif de Meyer, *très fortement alcalin,* sur l'urine à laquelle on le mélange par agitation; or, dans ces conditions, il est à peu près certain que l'hémolyse doive atteindre déjà son maximum. L'alcalinité du mélange de 2 cc. d'urine et de 1 cc. de réactif de Meyer est environ de 6,6 p. 100 en potasse, et l'on sait la facilité et l'instantanéité avec lesquelles des solutions aussi fortement alcalines sont hémolysantes.

De plus, les légères différences entre l'intensité des réactions de Meyer obtenues sur des dilutions de sang préalablement hémolysé dans l'urine sont trop minimes pour pouvoir permettre d'attribuer à une hémolyse l'action fortement sensibilisante de l'alcool acétique.

Nous nous sommes d'ailleurs assuré, par des expériences directes, que l'alcool acétique ou l'alcool seul n'agissent pas en augmentant l'hémolyse.

Nos expériences ont consisté à effectuer la réaction de Meyer comparativement avec ou sans alcool acétique sur des dilutions aqueuses ou urinaires où le sang était déjà hémolysé totalement.

a) *Réactions faites sur une dilution de sang dans l'eau distillée à* 1 *p.* 800.000

Meyer	Dilution sanguine aqueuse...	2 cc.	Réaction négative.
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2.....	IV gouttes	
Meyer modifié	Même dilution sanguine aqueuse	3 cc.	Au bout de quelques secondes coloration rose, intense et maximum après 4 minutes.
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2.....	IV gouttes	
Témoin	Eau distillée pure.....	3 cc.	Faible coloration rosée, nettement moins intense que la précédente et passagère.
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2.....	IV gouttes	

b) *Réactions faites sur une dilution de sang introduit déjà hémolysé dans une urine de D* = 1027. (*Taux de la dilution:* 1 *p.* 12.000.)

Meyer	Dilution sanguine aqueuse...	2 cc.	Réaction négative.
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	IV gouttes	
Meyer	Dilution sanguine aqueuse...	3 cc.	Coloration rose chair apparente au bout d'une minute et augmentant ensuite.
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2.....	IV gouttes	
Témoin	Même urine mais ne contenant pas de sang	3 cc.	Réaction absolument négative.
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2.....	IV gouttes	

La conclusion est donc bien nette, l'alcool acétique augmente encore de beaucoup la sensibilité de la réaction de Meyer dans des milieux où l'hémolyse est déjà absolument complète. Ce n'est donc pas du côté d'une action hémolysante qu'il faut chercher le mécanisme sensibilisateur.

2° Recherche d'une action sensibilisante de l'acide acétique seul et de l'alcool seul. Comparaison de l'action sensibilisante de l'alcool seul et de celle de l'alcool acétique.

L'acide acétique seul, aux doses où il est contenu dans l'alcool acétique à 2 p. 100, *ne sensibilise pas* la réaction de Meyer originelle s'il agit seul, qu'il soit mis au contact de l'urine seule ou au contact de l'urine préalablement mélangée au réactif de Meyer.

Les expériences de ce genre donnant toutes des résultats absolument négatifs, nous nous dispensons d'en relater les détails ici. Ajoutons seulement que l'acide acétique (doses correspondantes aux précédentes), mis au contact d'eau distillée au lieu d'urine, donne par lui-même avec le réactif de Meyer, une très légère coloration rose, un peu moins intense que celle que donne, dans les mêmes conditions, l'alcool acétique.

L'alcool seul, à l'inverse de l'acide acétique, *sensibilise beaucoup* la réaction de Meyer aux doses où il est contenu dans l'alcool acétique. Son action est un peu plus lente que celle de l'alcool acétique, mais elle arrive cependant, en général, à donner des réactions aussi intenses que dans le cas de l'alcool acétique.

Les réactions obtenues avec l'alcool seul au lieu d'alcool acétique (toujours aux mêmes doses que l'alcool acétique à 2 p. 100) sont *à peu près aussi stables* que dans le cas de l'alcool acétique. A une observation superficielle,

elles semblent même quelquefois beaucoup plus stables, par suite de la façon différente dont se comportent les deux milieux, urine — *alcool acétique* — Meyer — H^2O^2, d'une part, et urine — *alcool seul* — Meyer — H^2O^2, d'autre part, au point de vue des précipités qui s'y forment. Dans le cas du *mélange à l'alcool acétique,* il se fait un précipité floconneux blanc assez abondant, dont la teinte claire diminue l'intensité apparente de la coloration rose ou rouge du liquide; dans le cas du *mélange à l'alcool seul,* il ne se fait qu'un précipité beaucoup moins abondant, qui masque moins la coloration du liquide, de sorte que ce dernier, s'il a en réalité exactement la même coloration que le précédent, paraît plus coloré, et, s'il n'a qu'une coloration légèrement plus faible que le précédent, paraît aussi coloré que lui.

Il est facile d'éviter les erreurs d'appréciation dans la coloration en filtrant ou en centrifugeant les liquides: c'est de cette façon que nous avons pu conclure que, pour des doses respectives de 3 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100 et de 3 cc. d'alcool seul (à 90°), l'alcool acétique donne le maximum de rapidité à la réaction et le maximum de stabilité. Quant à l'intensité de la coloration dans les deux cas, elle arrive, à un moment donné, à être identique.

Voici quelques réactions où l'on peut constater la vérification des faits qui viennent d'être exposés:

Tableau

Comparaison de l'action de l'*ALCOOL ACÉTIQUE* et de l'*ALCOOL SEUL* dans la réaction de Meyer effectuée sur une dilution de sang dans l'urine à 1 p. 10.000 — Densité à l'urine = 1023

		VITESSE D'APPARITION DE LA RÉACTION	MAXIMUM D'INTENSITÉ	VITESSE DE DÉCOLORATION	OBSERVATIONS
Alcool seul	Urine hématiq. non cyanurée 3 cc. Alcool seul . . . . . 3 cc. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . IV gtes	Coloration	+ +	Décoloration	La longueur des *flèches ascendantes* sert de terme de comparaison à la vitesse d'apparition des diverses réactions colorées. Cette vitesse d'apparition est d'ailleurs très rapide (en quelques secondes) dans tous les tubes, sauf dans les témoins où la réaction est négative. La longueur des *flèches descendantes* sert de terme de comparaison à la vitesse de décoloration des diverses réactions colorées. Le *maximum d'intensité* des réactions colorées est représenté par le nombre de signes (+). On voit qu'il arrive à être le même dans tous les tubes.
Alcool acétique	Urine hématiq. non cyanurée 3 cc. Alcool acétique. . . . . 3 cc. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . IV gtes		+ +		
Alcool seul	Urine hématique cyanurée. 3 cc. Alcool seul . . . . . 3 cc. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . IV gtes		+ +		
Alcool acétique	Urine hématique cyanurée. 3 cc. Alcool acétique. . . . . 3 cc. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . IV gtes		+ +		
Alcool seul TÉMOINS.	Urine ident. *non* hématiq . 3 cc. Alcool seul . . . . . 3 cc. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . IV gtes	Réaction Négative			
Alcool acétique	Urine ident. NON hématique. 3 cc. Alcool acétique . . . . . 3 cc. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . IV gtes	Réaction Négative			

Lorsqu'il s'agit de dilutions sanguines dans l'urine à des taux extrêmement faibles, il arrive que l'alcool acétique (toujours à 3 cc. d'alcool acétique pour 3 cc. d'urine) provoque une réaction faible mais nette, alors que l'alcool seul est absolument insuffisant à déclancher la réaction.

Cet ensemble de faits montre que le principal agent intervenant dans le mécanisme de la sensibilisation est l'alcool, mais aussi que le rôle de l'acide acétique n'est pas négligeable, puisqu'il accélère l'apparition de la réaction, stabilise davantage la coloration obtenue et permet d'obtenir une réaction positive dans des urines faiblement hématiques où l'alcool seul était insuffisant à déclancher la réaction.

3° Influence de la dose d'acide acétique. Influence corrélative des variations de composition de l'urine

La dose d'acide acétique intervenant pour sensibiliser la réaction de Meyer doit-elle être toujours la même?

Nous avons opéré sur des dilutions sanguines dans l'urine en y ajoutant séparément l'alcool toujours en même proportion (3 cc.) et l'acide acétique dans des proportions voisines de celle où il se trouve dans l'alcool acétique à 2 p. 100.

Tantôt l'acide acétique était ajouté à l'alcool avant d'effectuer la réaction, tantôt au moment même de la réaction et dans le tube où on l'effectuait. Un fait remarquable est que, suivant les urines, le maximum d'intensité de la réaction ne se produit pas toujours avec des doses d'acide acétique correspondant aux proportions employées dans l'alcool acétique à 2 p. 100. Quelquefois c'est avec I goutte d'acide acétique, pour 3 cc. d'alcool que s'obtient le maximum d'intensité, quelquefois avec III à IV gouttes (pro-

portion correspondant à celle de l'alcool acétique à 2 p. 100). En tout cas, au-delà d'un certain nombre de gouttes (VI à VII) d'acide acétique, la réaction est totalement supprimée, ce qui se comprend très bien, puisque l'excès d'acide acétique diminue trop fortement ou supprime même complètement l'alcalinité nécessaire à la production de la coloration rouge de la phénolphtaléine.

Au point de vue pratique, un fait découle de ces observations: lorsqu'on a affaire à des urines où la réaction du sang est faible et paraît s'obtenir difficilement, il est très utile de faire une série de réactions en milieu alcool acétique, mais avec des teneurs en acide acétique variables. On arrive ainsi à saisir la concentration acide optima pour la réaction la plus intense.

On peut se servir soit d'alcools acétiques préparés d'avance à 0 cc. 5, 1 cc., 1 cc. 5, 2 cc., 2 cc. 5, 3 cc. d'acide acétique pour un volume total de 100 cc. d'alcool acétique; ou bien, on mélange d'abord plusieurs volumes de 3 cc. d'alcool respectivement avec I goutte, II gouttes, III gouttes, IV gouttes et V gouttes d'acide acétique et on ajoute, à chacun de ces mélanges, 3 cc. de l'urine à examiner. Il est alors facile de saisir, dans cette échelle de réactions, la limite d'acide qui convient le mieux pour les essais ultérieurs qu'on pourrait avoir à faire sur la même urine.

4° Influence de la dose d'alcool. Influence corrélative de la quantité de sang de l'urine

L'influence de la dose d'alcool sur les divers caractères de la réaction de Meyer est d'une extrême importance. Nous avons étudié l'influence des doses diverses d'alcool sur cette réaction effectuée uniquement en présence d'alcool et d'urine hématique et effectuée en présence d'alcool acétique.

Pour la réaction dans l'urine hématique en présence d'alcool seul, la proportion de 6 cc. d'alcool à 90° pour 3 cc. d'urine est préférable à tous les points de vue à la dose de 3 cc. d'alcool pour la même quantité d'urine: la rapidité de la réaction est plus grande, le maximum d'intensité est plus élevé et la coloration obtenue est plus stable.

Pour la réaction dans l'urine hématique en présence d'alcool acétique, l'addition de 3 cc. d'alcool à 90° à 3 cc. d'alcool acétique pour 3 cc. d'urine est très avantageuse: la réaction de Meyer n'apparaît alors qu'avec un léger retard sur la réaction de Meyer effectuée en présence de 3 cc. d'alcool acétique seul; mais le maximum d'intensité est beaucoup plus élevé que pour cette dernière et la rapidité de décoloration est beaucoup moins grande.

En ce qui concerne l'*ordre du mélange* de l'alcool acétique et de l'alcool devant agir sur une même urine, il est indifférent de faire agir préalablement sur l'urine soit l'alcool acétique avant l'alcool, soit l'alcool avant l'alcool acétique, soit le mélange de 3 cc. d'alcool et de 3 cc. d'alcool acétique.

Si l'on compare l'action du mélange à parties égales d'alcool et d'alcool acétique (3 cc. de chacun pour 3 cc. d'urine) et l'action d'un même volume d'alcool à 90° seul (6 cc. pour 3 cc. d'urine), on constate que la rapidité d'apparition de la réaction de Meyer et le maximum d'intensité sont les mêmes dans les deux cas, mais que la vitesse de décoloration dans le cas du mélange alcool et alcool acétique est un peu moins rapide que dans le cas de l'alcool seul.

Au point de vue pratique, il en résulte que l'on a intérêt, pour obtenir le maximum de netteté dans la réaction de Meyer, à l'effectuer en substituant à l'alcool acétique

à 2 p. 100 de Telmon un réactif composé de parties égales d'alcool acétique à 2 p. 100 et d'alcool à 90°, ou mieux à 95° (l'alcool à 95° s'étant montré plus actif que l'alcool à 90°). En d'autres termes, le réactif devient le suivant:

Alcool à 90° ou à 95°	99 cc.
Acide acétique crist.	1 cc.

Il semblerait alors qu'on pût renforcer encore la sensibilité de la réaction, en opérant avec une dose de 6 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100, mais l'acidité devient alors trop forte et la réaction est *négative*. On est donc obligé de maintenir une *acidité* correspondant aux 3 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100 pour 3 cc. d'urine, tout en doublant la dose d'*alcool*.

Dans le mélange de 3 cc. d'urine et 6 cc. d'alcool acétique à 1 p. 100, la *concentration* en acide acétique est plus faible que dans le mélange de 3 cc. d'urine et 3 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100; or, malgré cette plus faible concentration, le mélange sensibilise davantage la réaction de Meyer.

Il semble donc que l'excès d'alcool puisse suppléer dans une certaine mesure à l'acide acétique, du moins en ce qui concerne le maximum d'intensité et de stabilité de la réaction. Ce qui montre qu'il en est bien ainsi, c'est que l'alcool seul, à la dose de 6 cc. pour 3 cc. d'urine, donne aussi des réactions plus intenses que l'alcool acétique à 2 p. 100 lui-même, employé à la dose de 3 cc. pour 3 cc. d'urine.

Même pour des urines contenant très peu de sang, cette dose d'alcool peut déclancher la réaction comme le fait l'alcool acétique à 2 p. 100 (3 cc.), là où 3 cc. d'alcool seul étaient impuissants à la déclancher.

Les faits qui viennent d'être relatés sont basés sur de très nombreuses expériences. Pour résumer nous ne cite-

rons que deux tableaux de réactions où l'on peut trouver la confirmation des résultats exposés.

Note additionnelle. — Si on ajoute aux 3 cc. d'alcool acétique 3 cc. d'eau distillée au lieu d'alcool, ou aux 3 cc. d'alcool 3 cc. d'eau distillée, on n'obtient que des réactions extrêmement faibles. (Cf. 2e tableau.)

Voir Tableaux I et II.

Influence de la dose d'alcool sur la réaction de Meyer dans l'urine hématique, effectuée, soit en présence d'alcool seul, soit en présence d'alcool acétique.

Tableau I

		VITESSE D'APPARITION DE LA RÉACTION	MAXIMUM D'INTENSITÉ	VITESSE DE DÉCOLORATION	OBSERVATIONS
1	Urine hématique (très forte dilution sang.) 3 cc. *Alcool acétique* . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	+ + + + + Coloration	+ +	Décoloration	Les colorations apparaissent très vite, mais les différences d'apparition sont nettement appréciables. Les teintes obtenues comme maximum d'intensité sont dans les rouges cerise. La *décoloration* complète du N° 1 se fait en 25 minutes. 2 et 4 ont encore de belles colorations au bout de plusieurs heures.
2	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool acétique* . . . . 3 cc. *Alcool à 90°* . . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	+ + + +	+ + + +		
3	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool seul.* . . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	+ + +	+ +		
4	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool seul.* . . . . . 6 cc. R. Meyer . . . . . 3 cc. H^2O^3 . . . . . V gtes	+ + + + +	+ + + +		
5	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool acétique* . . . . 6 cc. R. Mayer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	**Néant** (La réaction ne peut pas se produire, à cause de la trop forte acidité des 6 cc. d'alcool acétique à 2 °/₀)			
6 Témoin	Urine *normale.* . . . . 3 cc. Alcool acétique . . . . 3 cc. Alcool . . . . . 3 cc. R Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	**Réaction Negative**			

Influence de Doses d'alcool, d'alcool acétique et d'eau

TABLEAU II

		VITESSE D'APPARITION DE LA RÉACTION	MAXIMUM D'INTENSITÉ	VITESSE DE DÉCOLORATION	OBSERVATIONS
1	Urine hématique (très forte dilution sang.) 3 cc. Alcool acétique . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	+ + + + +	+ +	Décoloration	Les colorations apparaissent très vite, mais les différences d'apparition sont nettement appréciables. Les teintes obtenues comme maximum d'intensité sont dans les rouges cerise.
2	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool acétique* . . . . 3 cc. *Eau distillée* . . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	**Traces passagères**			
3	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool acétique* . . . . 3 cc. *Alcool* . . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	+ + + +	+ + +		
4	Même urine . . . . . 3 cc. *Alcool* . . . . . 3 cc. *Eau distillée* . . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	**Traces passagères**			
5	Même urine . . . . . 3 cc. Alcool . . . . . 6 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	+ + + +	+ + +		
6 Témoin	Eau distillée . . . . . 3 cc. *Alcool acétique* . . . . 3 cc. *Alcool* . . . . . 3 cc. R. Meyer . . . . . 1 cc. H^2O^2 . . . . . V gtes	**Réaction négative** (Teinte des réactions à blanc)			

5° Influence de l'ordre du mélange des composés entrant dans la réaction

Nous avons vu tout à l'heure que, en ce qui concerne les mélanges d'alcool et d'alcool acétique, on pouvait, indifféremment, faire agir sur l'urine d'abord l'alcool ou d'abord l'alcool acétique.

On peut aussi faire agir, sur l'urine, d'abord le réactif de Meyer et ensuite l'alcool ou l'alcool acétique, après avoir mélangé le réactif de Meyer avec l'urine. On peut encore faire agir, sur l 'urine, d'abord l'acide acétique, puis l'alcool. Dans ces diverses conditions, les réactions obtenues sont absolument équivalentes.

Le fait d'obtenir des réactions équivalentes en ajoutant l'alcool acétique, soit sur l'urine avant le réactif de Meyer, soit sur le mélange, préalablement fait, d'urine et de réactif de Meyer (mélange très alcalin par conséquent), montre que l'action de l'acide acétique n'intervient dans la réaction que de deux façons possibles: ou bien par simple diminution de l'alcalinité, ou bien par l'acétate de potasse formé.

Nous verrons plus loin que la diminution d'alcalinité a son importance. De plus, nous pouvons dire, dès maintenant, que l'acétate de potasse formé intervient aussi, car la réaction de Meyer est plus intense dans l'urine, si on l'effectue en présence d'alcool et d'acétate de potasse, qu'en présence d'alcool seul. (La réaction de Meyer, effectuée dans l'urine hématique en présence de KCl ou de NaCl, ajouté aux mêmes proportions que l'acétate de potasse, n'est pas plus intense, au contraire, que dans le cas de l'alcool seul.)

6° Action sensibilisante d'acides et d'alcools autres que l'acide acétique et l'alcool éthylique. Doses respectives. Action de divers sels.

L'alcool éthylique et l'acide acétique ne représentent pas le seul alcool et le seul acide capables de sensibiliser la réaction de Meyer.

Nous avons examiné l'action de l'*alcool méthylique,* des *alcools butyliques,* de la *glycérine* (en tant qu'alcool triatomique), de *l'acide tartrique,* de l'*acide lactique,* de l'*acide formique,* de l'*acide chlorhydrique* et de l'*acide azotique.*

L'alcool acétique ou l'alcool éthylique seul se sont montrés supérieurs, au point de vue de la sensibilisation de la réaction, à l'alcool méthylique seul et à l'alcool méthylique acétique. De plus, les teintes obtenues sont bien moins stables. Cependant, ils augmentent déjà la sensibilité de la réaction de Meyer. L'alcool butylique, au contraire, n'a aucune action de ce genre, pas plus que la glycérine.

L'alcool lactique, employé à 1, 2, 3 p. 100 d'alcool, a montré une action sensibilisatrice tout à fait analogue à celle de l'alcool acétique.

L'alcool tartrique, employé dans les mêmes conditions, s'est montré moins actif que l'alcool acétique.

L'alcool formique sensibilise la réaction à peu près dans les limites de l'alcool acétique, pourvu que l'on ne l'emploie au-dessus de 2 p. 100.

Avec des mélanges d'alcool et d'acide chlorhydrique, dans les proportions de II à IV gouttes d'acide chlorhydrique pour 3 cc. d'alcool, on sensibilise la réaction de Meyer mieux encore qu'avec l'alcool acétique. Les colorations obtenues peuvent être notamment bien plus intenses et

plus durables même ; mais il faut bien avoir soin de ne pas employer un excès d'acide, sinon la réaction n'apparaît pas.

Avec l'alcool azotique, dans les proportions de III à IV gouttes d'acide azotique ordinaire pour 3 cc. d'alcool, on obtient des sensibilisations tout à fait analogues à celles de l'alcool chlorhydrique.

Avec des mélanges d'azotate de potasse et d'alcool, on obtient des sensibilisations un peu moins marquées que précédemment, mais plus marquées néanmoins qu'avec l'alcool seul.

De même que dans le cas de l'alcool acétique, on peut indifféremment ajouter l'alcool azotique à l'urine, soit directement, soit après mélange de l'urine avec le réactif de Meyer.

7° Nouvelles modifications à apporter à la réaction de Meyer sensibilisée, en vue d'obtenir le maximum d'intensité.

Les diverses particularités que nous avons relatées dans les paragraphes précédents sont utilisables *au point de vue pratique* pour effectuer la réaction de Meyer sensibilisée, et obtenir le maximum d'intensité. Nous allons les grouper ici en ne gardant que les points directement applicables au point de vue pratique.

Après avoir effectué la réaction de Meyer, modifiée par Telmon (3 cc. d'urine, 3 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100, 1 cc. de réactif de Meyer, IV gouttes d'H^2O^2), si l'urine ne contient qu'extrêmement peu de sang, on effectuera les réactions suivantes qui pourront donner plus de certitude ou de netteté dans les résultats.

Au lieu d'ajouter de l'alcool acétique préparé à l'avance, on ajoutera à des volumes d'urine de 3 cc. succes-

sifs, respectivement II gouttes, III gouttes, IV gouttes d'acide acétique, gouttes soit préalablement dissoutes dans 3 cc. d'alcool à 95°, soit dissoutes dans le mélange d'alcool et d'urine. Au lieu de 3 cc. d'alcool pour chaque prise, il vaudra même mieux employer 6 cc. d'alcool. L'eau oxygénée sera versée de II gouttes en II gouttes dans chaque tube à essai et, avant d'agiter le mélange total, on observera les *stries* ou *nuages* colorés, permettant de saisir exactement le début de chaque réaction.

Au bout de quelques minutes et après agitation, on ajoutera de nouveau II gouttes d'eau oxygénée dans chaque tube, on agitera à nouveau et on observera les colorations obtenues. On pourra, un peu plus tard, encore ajouter une nouvelle série de II gouttes d'H^2O^2.

On ne devra jamais manquer d'établir un témoin avec de l'eau distillée au lieu d'urine et un témoin avec une urine normale préalablement reconnue non hématique et autant que possible de densité voisine de celle dans laquelle on recherche le sang.

Si l'urine examinée donne des réactions fortement positives, on en portera un autre échantillon à l'ébullition, et on effectuera ensuite sur lui la réaction reconnue comme donnant le maximum d'intensité dans la série précédente. Le résultat obtenu permettra d'éliminer les facteurs autres que le sang pouvant intervenir dans la réaction. Il ne faut pas perdre de vue, nous le rappelons encore, que cependant le simple chauffage d'une urine ou d'un liquide ne contenant que du sang donne une réaction *un peu* moins intense qu'avant chauffage.

Si l'urine examinée avant chauffage ne donne, au contraire, qu'une réaction faiblement positive, mais nette, ou simplement douteuse, il faudra aussi la chauffer : si alors, après chauffage, il persiste encore une teinte assez nette

et si l'urine en question a une densité normale, on pourra conclure de façon ferme à la présence du sang, après s'être assuré que l'individu dont elle provient n'a absorbé aucune substance médicamenteuse ou toxique pouvant influencer la réaction. Si la même urine était de densité faible, il faudrait refaire sur elle les mêmes épreuves après l'avoir additionnée de son volume d'urine normale ou d'un demi-volume d'extrait urinaire préparé suivant les indications données plus haut.

Enfin, surtout dans les cas où on obtient une réaction finalement peu nette, il sera avantageux d'employer l'alcool chlorhydrique ou l'alcool nitrique en utilisant des mélanges de II à IV d'HCl pour 3 cc.-6 cc. d'alcool ou de II à IV d'acide azotique ordinaire pour 3 cc.-6 cc. d'alcool.

8° Utilisation des données précédentes pour l'explication du mécanisme de l'action sensibilisante de l'alcool acétique. Celle-ci est-elle en rapport avec un processus d'hématinisation ?

Dans l'étude qui concerne le mécanisme de l'action sensibilisante de l'alcool acétique vis-à-vis de la réaction de Meyer, nous avons déjà vu que la principale part revient à l'alcool, mais que l'acide acétique joue aussi un rôle non négligeable. D'autre part, nous avons bien mis en évidence que divers alcools-acides, tels que l'alcool formique, l'alcool lactique, l'alcool chlorhydrique, l'alcool nitrique, possédaient aussi, à un haut degré, une action sensibilisante pour la réaction de Meyer.

Or, on sait que les alcools-acides, en général, ont la propriété d'hématiniser très rapidement l'hémoglobine, soit dissoute, soit fixée sur le globule. Il était, dès lors, tout indiqué de se demander si l'augmentation de sensibilité

par l'alcool acétique n'était pas due tout simplement à son action hématinisante,

L'idée était d'autant plus logique et rationnelle qu'on concevait très bien, *a priori,* que le noyau ferrugineux de l'hémoglobine, le vecteur à proprement parler de la propriété peroxydasique du globule rouge, l'hématine, pût posséder, après sa scission de l'hémoglobine, l'action peroxydasique à un plus haut degré que l'hémoglobine elle-même. Nous avons donc fait une série de recherches destinées à élucider si l'alcool acétique agissait vraiment comme hématinisant.

a) *Action de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer faite sur l'hématine elle-même en solution urinaire ou alcaline, chauffée et non chauffée.*

Nous avons broyé dans un mortier une petite quantité d'hématine pure en présence de quelques gouttes d'urine normale (D = 1023), de façon à obtenir, par suite de l'état très divisé de l'hématine et du pouvoir solubilisant de l'urine sur ce corps (faible mais net) un mélange qui, additionné ensuite progressivement de quantités croissantes d'urine, nous donnât, après filtration, une urine contenant de l'hématine à l'état *libre.* Cette urine hématinique n'était que très légèrement plus colorée que celle qui avait servi à sa préparation. C'est sur elle que nous avons comparé la réaction de Meyer originelle avec la réaction de Meyer modifiée par addition d'alcool acétique. Or, nous avons ainsi constaté que la réaction de Meyer originelle y était absolument négative, tandis que la même réaction, effectuée après addition d'alcool acétique à 2 p. 100 ou même d'alcool seul, donnait une réaction extrêmement positive. Voici un type de ces réactions comparées, faites sans al-

cool acétique, avec alcool, avec alcool acétique, la réaction avec l'alcool acétique étant effectuée aussi sur la même urine non hématinique comme épreuve témoin.

Meyer originelle	Urine hématinique.....	2 cc.	Réaction absolument négative.
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	IV gouttes	
Meyer alcool acétique	Urine hématinique.....	3 cc.	Superbe coloration fuchsine très intense.
	Alcool acétique.	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V gouttes	
Meyer alcool seul	Urine hématinique.....	3 cc.	Coloration analogue à la précédente, un peu moins intense.
	Alcool à 90°....	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2.....	V gouttes	
Témoin	Urine normale (la précédente avant hématinisation).....	3 cc.	Réaction absolument négative.
	Alcool acétique.	3 cc.	
	Réact. de Meyer.	1 cc.	
	H^2O^2.....	V gouttes	

Malgré la netteté de ces résultats, une objection pouvait encore être émise : dans l'urine rendue artificiellement hématinique, on pouvait alléguer que si l'alcool acétique augmentait la sensibilité de la réaction, c'était uniquement en solubilisant, au sens strict du mot, l'hématine introduite qui n'y serait restée qu'à un état de solubilisation incomplète, de suspension fine (pseudo-solution). Il y avait donc lieu de refaire les mêmes réactions dans un milieu où l'hématine devait être parfaitement solubilisée, un milieu fortement alcalin par exemple. Si l'on veut bien réfléchir,

on comprend déjà que l'objection en question tombe d'elle-même puisque, dans l'urine rendue artificiellement hématinique, l'addition seule du réactif de Meyer réalise immédiatement dans cette urine une alcalinité bien suffisante pour dissoudre complètement l'hématine. (L'alcalinité du mélange de 2 cc. d'urine + 1 cc. de réactif de Meyer représente au moins 6,6 p. 100 en potasse !)

Néanmoins, nous avons refait la même série de réactions précédemment indiquée sur une solution d'hématine dans de la potasse à 10 p. 100 : les résultats ont été absolument les mêmes que dans le cas de l'urine artificiellement hématinique.

Meyer Originelle	Solution alcaline d'hématine...	2 cc.	Réaction négative (la solution d'hématine était très étendue).
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	IV gouttes	
Meyer Alcool acétique	Solution alcaline d'hématine...	3 cc.	Superbe coloration, fuchsine intense
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V gouttes	
Meyer Alcool seul	Solution alcaline d'hématine...	3 cc.	Coloration analogue à la précédente, un peu moins marquée.
	Alcool à 90°. ...	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V gouttes	
Témoin	Solution alcaline d'hématine. .	3 cc.	Réaction pratiquement négative.
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réact. de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V goutte	

Ces faits seuls montrent déjà que l'alcool acétique agit au moins par un mécanisme autre qu'un mécanisme simplement hématinisant. On peut leur ajouter aussi, pour

confirmer encore cette conclusion, ce fait que la simple addition de 1 cc. de réactif de Meyer à 2 cc. d'urine *hémoglobinique* ou *hématique,* suffit, même à froid, à hématiniser l'hémoglobine.

Cependant, nous avons fait encore d'autres séries d'expériences confirmant encore de façon plus démonstrative que l'alcool acétique n'agit pas du tout comme hématinisant.

b) *Action du chauffage en milieu alcoolique ou alcoolique acétique sur les dilutions sanguines hémoglobiniques, aqueuses ou urinaires.*

Si l'on porte à l'ébullition, en présence d'alcool seul ou d'alcool acétique, des dilutions sanguines ou hémoglobiniques aqueuses ou urinaires, et si l'on compare ensuite l'intensité de la réaction de Meyer (en milieu alcool acétique) avec celle de la même réaction sur les mêmes solutions non chauffées, on constate qu'elle est nettement moins intense. Cependant l'hématinisation possible par l'alcool ou l'alcool acétique a été poussée au maximum puisqu'elle a été faite à chaud. L'hématinisation complète donne donc des résultats moins marqués qu'une hématinisation, semble-t-il, moins complète. Le facteur d'hématinisation paraît donc devoir jouer un rôle bien insuffisant pour expliquer l'action de l'alcool acétique.

c) *Action du chauffage préalable en milieu alcalin sur les dilutions sanguines ou hémoglobiniques, aqueuses ou urinaires.*

Si l'on porte à l'ébullition, en milieu fortement alcalin, des dilutions de sang ou d'hémoglobine aqueuses ou urinaires, on constate encore que la réaction de Meyer, effec-

tuée ensuite en présence d'alcool acétique, est moins intense qu'avant chauffage. L'hématinisation est pourtant complète. Ce fait montre encore que l'hématinisation n'intervient pas dans l'augmentation de sensibilité de la réaction de Meyer.

d) *Action de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer effectuée comparativement sur des solutions équimoléculaires d'hémoglobine ou d'hématine.*

Nous avons comparé enfin l'intensité de la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique, comparativement sur une solution d'hémoglobine d'un titre déterminé et sur une solution d'hématine correspondant au taux hématinique de la solution hémoglobinique précédente. On sait que une molécule d'hémoglobine donne, parmi ses produits de dédoublement, une molécule d'hématine, chaque molécule d'hémoglobine et d'hématine ayant, d'ailleurs, la même teneur en fer. Les solutions d'hémoglobine et d'hématine qui peuvent être comparées au point de vue de leur activité peroxydasique due au fer, sont donc des solutions équimoléculaires. Nous avons indiqué la préparation et le titre des solutions que nous avons employés dans un chapitre ultérieur de ce travail ayant trait à l'activité peroxydasique comparée du fer, suivant la complexité de sa combinaison moléculaire. En ce qui intéresse le point actuellement traité, de la comparaison de la sensibilité de la réaction de Meyer en milieu alcool acétique sur des solutions équimoléculaires d'hémoglobine et d'hématine, nous donnerons seulement le résultat de nos expériences; les détails de celles-ci se trouvent plus loin, dans le chapitre auquel nous venons de faire allusion.

Or, la conclusion de ces expériences est celle-ci: la sensibilité à la réaction de Meyer, en présence d'alcool acéti-

que, est bien plus grande pour la solution équimoléculaire d'hémoglobine que pour la solution équimoléculaire d'hématine. L'alcool acétique n'agit donc pas en hématinisant l'hémoglobine, puisqu'une solution d'hématine donne une réaction moins sensible qu'une solution d'hémoglobine, et puisque, nous l'avons vu, une solution d'hématine elle-même est rendue plus sensible à la réaction de Meyer par l'addition d'alcool acétique.

La conclusion générale de ces séries d'expériences, c'est que *l'action sensibilisante de l'alcool acétique ne résulte pas de son action hématinisante.* Ce fait s'accorde très bien d'ailleurs avec la constatation déjà notée que l'alcool acétique donne la réaction de Meyer en présence d'eau distillée, alors que le réactif de Meyer, mis seul au contact de l'eau distillée, ne donne absolument aucune réaction. Dans ce cas, il ne peut pas être question d'une hématinisation et cependant l'alcool acétique a sensibilisé le réactif de Meyer à l'oxydation, il s'est fait là en quelque sorte une *réaction d'amorce à blanc*, ce qui semblerait indiquer que l'alcool acétique pût agir en favorisant le déclanchement de la réaction de Meyer.

9° L'alcool acétique augmente la sensibilité de la réaction de Meyer en diminuant l'action des facteurs de décoloration de la phénolphtaléine, formée déjà dans la « réaction d'amorce à blanc. »

C'est en étudiant le mécanisme de la décoloration, comparativement dans les réactions effectuées avec le réactif de Meyer seul et avec le réactif de Meyer en présence d'alcool acétique, que nous sommes arrivé, pensons-nous, à pouvoir expliquer le mécanisme sensibilisateur de l'alcool acétique.

A. *Etude des facteurs de décoloration. — Quels sont donc les facteurs qui peuvent intervenir dans la production de la décoloration de la phénolphtaléine, à l'état de sel, formée par l'oxydation du réactif de Meyer?*

A priori, on peut distinguer trois cas:

a) Le cas de la décoloration pour les réactions effectuées dans l'urine;

b) Le cas de la décoloration pour les réactions effectuées sur le sang, l'hémoglobine ou l'hématine en solutions aqueuses;

c) Le cas de la décoloration dans le mélange eau distillée, alcool acétique et réactif de Meyer.

a) *Dans l'urine.* — La décoloration pourrait être due:

1° A la formation de *composés ammoniacaux;*

2° Au *pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin.* (On sait que l'urine, en milieu alcalin, est capable de décolorer par réduction certaines matières colorantes, telles que le bleu de méthylène);

3° A l'*alcalinité forte* du mélange d'urine et de réactif de Meyer (indépendamment de l'action réductrice spéciale de l'urine en milieu alcalin);

4° Au résultat d'une *décomposition plus ou moins avancée de l'hématine* toujours en milieu alcalin, dont le fer passerait partiellement à un état inactif et dont le reste de la molécule donnerait lieu à la formation de composés réducteurs;

5° A l'action possible d'une suroxydation lente due à la décomposition progressive de l'*eau oxygénée;*

6° A l'action possible du *zincate de potasse* formé dans la préparation du réactif de Meyer ou à l'action des *pro-*

duits de décomposition de ce zincate par l'eau oxygénée (ZnO, ZnO^2 ?).

7° A l'action possible de l'*acétate de potasse* formé par l'acide acétique au contact de la potasse du réactif.

b) *Dans les solutions* AQUEUSES *d'hémoglobine ou d'hématine:* la décoloration pourrait être due aux cinq derniers facteurs qui viennent d'être énumérés pour le cas de l'urine (c'est-à-dire aux facteurs n^{os} 3, 4, 5, 6 et 7), ce qui expliquerait qu'elle se produise plus rapidement que pour l'urine.

c) *Dans le cas de la décoloration de la* « RÉACTION A BLANC » DANS L'EAU DISTILLÉE: la décoloration pourrait s'expliquer par l'intervention des facteurs n^{os} 3, 5, 6 et 7.

Nous allons étudier successivement ces divers facteurs au point de vue de l'explication qu'ils peuvent fournir au sujet de la décoloration en question.

Formation de composés ammoniacaux dans l'urine. — Les composés ammoniacaux qui peuvent se former dans l'urine par suite de l'addition du réactif de Meyer très alcalin ne paraissent avoir aucune action sur la décoloration de la phénolphtaléine, si l'on en juge d'après des expériences où nous avons comparé la vitesse de décoloration de solutions de petites quantités de phtaléine en milieux d'alcalinité plus ou moins forte, additionnés ou non de petites quantités d'ammoniaque.

Pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin. — Pour juger de l'action de ce facteur sur la décoloration, nous avons fait les expériences suivantes:

	Urine normale ..	2 cc.	Décoloration beaucoup plus rapide dans le cas de l'urine que dans le cas de l'eau.
	KOH à 20 grammes pour 100 cc. d'eau (1)	1 cc.	
	Solution alcool. de phénolphtaléine	1 goutte.	
Témoin	Eau distillée.....	2 cc.	
	KOH à 20 grammes pour 100 cc. d'eau.....	1 cc.	
	Solution alcool. de phénolphtaléine	1 goutte.	

Les mêmes réactions, effectuées en se servant, au lieu d'une solution de phénolphtaléine alcoolique, d'une solution aqueuse du sel de soude coloré de la phénolphtaléine (disodoquinonephénolphtaléinique ou aci-phénolphtaléine disodique isolé par Fleig), donnent les mêmes résultats.

Donc, l'urine, en milieu alcalin, possède vraiment un pouvoir réducteur vis-à-vis de la phénolphtaléine formée dans la réaction de Meyer.

Alcalinité forte du mélange d'urine et de réactif de Meyer. — Ce facteur intervient aussi pour expliquer la décoloration, ainsi que le montrent les réactions suivantes, et son action se manifeste aussi bien pour les dilutions de sang dans l'eau que pour les dilutions de sang dans l'urine.

Solution de potasse à 1 p. 100.	3 cc.	Coloration fuchsine extrêmement persistante à peine affaiblie au bout de plusieurs heures.
Phénolphtaléine en solution alcoolique	1 goutte.	

(1) Proportion approximative du réactif de Meyer.

Solution de potasse à 6,6 pour 100 (Concentration correspondant à l'alcalinité du mélange de 2 cc. d'urine et de 1 cc. du réactif de Meyer)	3 cc.	Au bout de 10′ il ne reste qu'une légère teinte rose.
Phénolphtaléine en solution alcoolique	1 goutte.	

Ce facteur intervient à la fois pour expliquer les décolorations des solutions sanguines, aqueuses et urinaires et pour expliquer la décoloration de la « réaction à blanc » dans l'eau distillée.

Recherche d'une action décolorante par formation de composés réducteurs provenant de la décomposition de l'hématine en milieu alcalin. — Les réactions que nous avons faites à ce point de vue nous ont montré un résultat pratiquement négatif.

On dissout 0 gr. 005 d'hématine pure dans 100 cc. de potasse à 1 p. 100 et 0 gr. 005 dans 100 cc. de potasse à 6,66 p. 100 (concentration en potasse correspondant approximativement à l'alcalinité du mélange de 2 cc. d'urine et de 1 cc. de réactif de Meyer). On a ainsi une solution d'hématine dite « *faiblement alcaline* » et une solution d'hématine dite « *fortement alcaline* ». On a, d'autre part, des solutions de potasse à 1 p. 100 et à 6,66 p. 100 servant de témoins aux précédentes dans les réactions effectuées.

On recherche l'influence d'une décomposition possible de l'hématine soit en milieu alcalin seul (faiblement ou fortement alcalin), soit en milieu alcalin additionné d'eau oxygénée; on effectue, dans ce but, les réactions qui suivent:

Tableau

Recherche d'une *Action décolorante des produits de décomposition de l'hématine en milieu alcalin*, en présence ou non d'eau oxygénée : *RÉSULTATS NÉGATIFS.* TABLEAU IV

		RÉACTIONS	RÉSULTATS DES DIFFÉRENTES RÉACTIONS	OBSERVATIONS GÉNÉRALES
Avec Hématine	1	Sol. *faiblement* alcaline d'hématine 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. 1 gte	La coloration fuchsine est extrêmement persistante, n'est que très peu diminuée au bout d'une heure et demie et même au bout de 3 heures.	L'hématine en présence ou non d'H^2O^2, et en milieu alcalin, n'a pas d'action décolorante plus marquée que les simples solutions alcalines témoins (additionnées ou non d'H^2O^2).
	2	Sol. *faiblement* alcaline d'hématine 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. I gte H^2O^2 . . . . . II gtes	Décoloration complète en 11 minutes.	
	3	Sol. *fortement* alcaline d'hématine. 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. I gte	Décoloration à peu près totale en 6 minutes. — Il reste cependant, et de façon définitive, une teinte difficile à qualifier étant donnée la coloration propre de la solution d'hématine. Cette teinte n'est pas vraiment du rose, mais suffit cependant à différencier légèrement le tube présent du tube suivant où la disparition de toute teinte rose est rapidement complète.	
	4	Sol. *fortement* alcaline d'hématine 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. I gte H^2O^2 . . . . . II gtes	Décoloration complète en 3 minutes.	
Sans Hématine (*Témoins*)	5	Sol *faiblement* alcaline . . . . 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine . I gte	La coloration fuchsine est extrêmement persistante et très peu diminuée, même au bout de plusieurs heures. (Décoloration tout à fait comparable à celle du tube 1).	
	6	Sol. *faiblement* alcaline . . . . 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. I gte H^2O^2 . . . . . II gtes	Décoloration complète en 11 minutes.	
	7	Sol. *fortement* alcaline . . . . 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. I gte	Au bout de 8 à 10 minutes, il ne reste qu'une très légère teinte rose qui persiste cependant, très nette, mais infinie, même au bout de plusieurs heures. La solution, non hématine, que permet d'apprécier plus facilement la teinte rose que dans le tube 3, mais si l'on tient compte de la différence initiale des deux solutions hématinique et non hématinique, on doit conclure que la vitesse de décoloration est la même dans les deux cas.	
	8	Sol. *fortement* alcaline . . . . 3 cc. Sol. alcooliq. de phénolphtaléine. I gte H^2O^2 . . . . . II gtes	→ = Décoloration complète en 3 minutes.	

Action décolorante de l'eau oxygénée. — L'examen détaillé du tableau de réactions précédentes suffit seul à montrer que l'eau oxygénée a une action décolorante marquée vis-à-vis de la phénolphtaléine alcaline : en effet, les tubes 2 et 6 se décolorent complètement en 11 minutes, les tubes 4 et 8 se décolorent complètement en 3 minutes ; ce sont ceux qui ont été additionnés d'eau oxygénée.

D'ailleurs, plus on augmente la proportion d'eau oxygénée, plus la décoloration est rapide.

L'eau oxygénée paraît agir directement sur la phénolphtaléine alcaline, et non indirectement par décomposition de certaines substances de l'urine qui, à leur tour, ensuite, produiraient la décoloration, puisque ces phénomènes de décoloration par l'H^2O^2 s'observent très nettement en dehors de l'urine, dans des solutions aqueuses simplement alcalines.

Le facteur eau oxygénée intervient donc pour expliquer la décoloration à la fois dans l'urine hématique, dans les solutions aqueuses d'hémoglobine ou d'hématine et dans la « réaction à blanc » de l'eau distillée.

Action décolorante du zincate de potasse. — Le zincate de potasse, formé dans la préparation du réactif de Meyer ou les produits de décomposition possible de ce zincate par H^2O^2, ont une *action décolorante très nette,* ainsi que le montrent les réactions qui vont suivre. Le zincate que nous avons utilisé était préparé dans les mêmes conditions que celles où il se forme dans la confection du réactif de Meyer. On portait à l'ébullition 10 grammes de zinc en poudre impalpable au contact d'une solution composée de 20 grammes de potasse pour 100 cc. d'eau ; le liquide était ensuite filtré chaud.

Pour étudier la décoloration produite par le zincate, on

comparait avec elle l'action décolorante produite par une simple solution de potasse à 20 grammes pour 100 cc. d'eau.

1	Urine normale.....	2 cc.	La décoloration de 2 est infiniment plus rapide que celle de 1 et est complète en 3 minutes.
	KOH. à 20 p 100.....	1 cc.	
	Sol. alcool. de phénolphtaléine.....	I goutte	
2	Urine normale.....	2 cc.	
	Sol. de zincate.....	1 cc.	
	Sol. alcool. de phénolphtaléine	I goutte	
1	Eau distillée.....	2 cc.	La décoloration de 2 est infiniment plus rapide que celle de 1.
	KOH à 20 p. 100.....	1 cc.	
	Sol. alcool. de phénolphtaléine.....	I goutte	
2	Eau distillés..... ...	2 cc.	
	Sol. de zincate.....	1 cc.	
	Sol. alcool. de phénolphtaléine.....	I goutte	
1	Eau distillée.....	2 cc.	La décoloration est bien plus rapide dans 2 que dans 1.
	Sol. de zincate.....	1 cc.	
	Sol. alcool. de phénolphtaléine.....	I goutte	
2	Eau distillée.....	2 cc.	
	Sol. de zincate.....	1 cc.	
	Sol. alcool. de phénolphtaléine.....	I goutte	
	H^2O^2	II gouttes	

L'action décolorante du zincate de potasse est applicable à la fois aux décolorations dans l'urine, dans les solutions aqueuses d'hémoglobine et d'hématine et dans la « réaction à blanc » de l'eau distillée.

L'acétate de potasse, aux doses où il peut se trouver dans le mélange de 3 cc. d'urine, 3 cc. d'alcool acétique et de 1 cc. de réactif de Meyer, n'a pas d'action décolorante pouvant intervenir pratiquement.

L'étude des facteurs de décoloration, qui viennent d'être passés en revue, nous fait bien comprendre que, pour des dilutions *urinaires* et *aqueuses* contenant la MÊME *quantité de sang,* d'hémoglobine ou d'hématine, la décoloration, après la réaction de Meyer effectuée, doit être plus intense et plus rapide dans les cas des solutions urinaires que dans celui des solutions aqueuses: dans le cas des solutions urinaires, en effet, intervient un facteur de décoloration très important, le pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin, dont il ne peut pas être question pour les solutions aqueuses.

Le même facteur explique aussi que, toutes choses égales d'ailleurs, la décoloration se produit d'autant plus facilement que l'urine est plus dense, partant plus chargée en principes réducteurs décolorants; si alors on inverse le raisonnement, on s'explique très bien enfin que l'apparition de la réaction, c'est-à-dire la coloration apparaisse, au contraire, d'autant plus facilement que l'urine est moins dense.

Si, des solutions aqueuses hématiques, on passe maintenant à la simple eau distillée pour chercher à expliquer la décoloration qui succède à la production de réaction colorée par mélange à l'eau distillée d'alcool acétique, de réactif de Meyer et d'H^2O^2, on pourra l'expliquer très facilement par les mêmes facteurs que nous avons vu intervenir pour les solutions hématiques aqueuses. Que si la décoloration, dans le cas de cette « réaction à blanc », est beaucoup plus rapide que dans le cas des solutions *hématiques* aqueuses, bien que les mêmes facteurs interviennent pour

la produire, c'est que, dans le premier cas, la réaction colorée est extrêmement faible, tandis que, dans le second, elle est toujours beaucoup plus forte. Les facteurs décolorants doivent donc agir bien mieux dans le premier cas que dans le second.

B. *Action antagoniste de l'alcool acétique vis-à-vis des facteurs de décoloration. Importance respective de l'alcool seul, de l'acide acétique seul, et de l'alcool acétique dans cette action antagoniste.*

Le mode d'action de l'alcool acétique s'explique justement par le fait que celui-ci empêche, dans une plus ou moins grande mesure, l'action des divers facteurs décolorants que nous venons de passer en revue et de reconnaître efficaces.

α *Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due au pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin.* — Si l'on se rappelle les réactions que nous avons effectuées pour mettre en évidence le pouvoir décolorant de l'urine en milieu alcalin, on comprendra vite les réactions qu'il est utile de faire pour chercher s'il existe une action antagoniste de l'alcool acétique.

Voici quatre réactions types à ce point de vue :

Réaction montrant le pouvoir décolorant de l'urine en milieu alcalin.				Décoloration beaucoup plus rapide dans le cas de l'urine que dans le cas de l'eau.
	1	Urine normale.....	2 cc.	
		KOH à 20 grammes p. 100 d'eau	1 cc.	
		Sol. alcooliq. de phénolphtaléine.....	1 goutte.	
	2	Eau distillée.....	2 cc.	
		KOH à 20 pour 100...	1 cc.	
		Sol. alcooliq. de phénolphtaléine.....	1 goutte.	

Réactions montrant le pouvoir antagoniste de l'alcool acétique vis-à-vis de cette décoloration.

1	Urine normale	3 cc	La différence de rapidité dans la décoloration pour le cas de l'urine et pour le cas de l'eau est beaucoup moins marquée que dans les réactions précédentes.
	Alcool acétique	3 cc.	
	KOH à 20 pour 100	1 cc.	
	Sol. alcooliq. de phénolphtaléine	1 goutte.	
2	Eau distillée	3 cc	
	Alcool acétique	3 cc.	
	KOH à 20 p. 100	1 cc.	
	Sol. alcooliq. de phénolphtaléine	1 goutte.	

6 *Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due à la forte alcalinité du mélange d'urine et de réactif de Meyer.* — En effectuant, en présence d'alcool acétique, les réactions qui nous ont servi à établir l'action décolorante de la forte alcalinité, on trouve que l'alcool acétique manifeste une action antagoniste très nette vis-à-vis de cette action décolorante. On en a un aperçu dans les deux réactions suivantes :

1	Sol. de potasse à 6,6 p. 100	3 cc	Au bout de 10 minutes, il ne reste plus qu'une légère teinte rose.
	Sol. alcooliq. de phénolphtaléine	1 goutte	
2	Sol. de potasse à 6,6 p. 100	3 cc.	La coloration fuchsine n'a fait simplement que diminuer en 24 heures.
	Alcool acétique à 2 p. 100	3 cc.	
	Sol. alcooliq. de phénolphtaléine	1 goutte	
3	Sol. de potasse à 6,6 p. 100	3 cc.	Coloration beaucoup moins persistante que la précédente
	Eau distillée	3 cc.	
	Sol. alcooliq. de phénolphtaléine	1 goutte	

γ *Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due à l'eau oxygénée.* — Des réactions de même genre, effectuées sur des solutions d'alcalinité diverses, en

présence d'H^2O^2, avec ou sans alcool acétique, montrent que la décoloration de la phénolphtaléine alcaline par l'eau oxygénée est beaucoup moins rapide en présence d'alcool acétique que sans alcool acétique, ou qu'en présence d'une même quantité d'eau.

δ *Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due au zincate de potasse.* — Les mêmes réactions que nous avons mentionnées à propos de l'action décolorante du zincate, effectuées à nouveau comparativement en présence d'alcool acétique, montrent que ce dernier a une action antagoniste très nette vis-à-vis de la décoloration par le zincate de potasse.

L'alcool acétique a donc des actions antagonistes bien évidentes vis-à-vis des divers facteurs de décoloration. Essayons maintenant de faire la part de l'acide acétique et de l'alcool dans ce mécanisme antagoniste.

a) *Acide acétique seul.* — Le calcul montre que la proportion de 3 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100 pour 3 cc. d'urine et 1 cc. de réactif de Meyer introduit dans le mélange une dose d'acide acétique telle, qu'elle neutralise à peu près le tiers de la potasse du réactif. L'acide acétique seul fait donc baisser la forte alcalinité d'un tiers.

Il en serait du moins ainsi si l'acide acétique était ajouté sans l'alcool; mais comme, pratiquement, il est ajouté avec l'alcool, c'est-à-dire que, pour 1 cc. de réactif de Meyer, on met en présence 3 cc. d'alcool acétique et 3 cc. d'urine, la diminution d'alcalinité est encore bien plus marquée. Il y a une diminution *vraie* en potasse de un tiers environ, nous venons de le voir, mais, en outre, il y a dilution de la potasse qui reste, dans 7 cc. (3 cc. d'urine, 3 cc. d'alcool acétique, 1 cc. de réactif de Meyer), soit au total une diminution de la *concentration* en potasse très marquée par rapport à la concentration en potasse

dans le Meyer originel. Dans cette diminution d'alcalinité, l'acide acétique seul a une part importante, de sorte qu'on peut lui attribuer un rôle antagoniste partiel dans la diminution du facteur décolorant dû à la forte alcalinité et au pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin. D'autre part, l'acide acétique peut avoir un certain rôle antagoniste vis-à-vis de la décoloration par l'eau oxygénée : celle-ci n'est stable qu'en milieu acide et, si l'on admet qu'elle est d'autant moins stable que le milieu est plus alcalin, on comprend le rôle possible de l'acide acétique vis-à-vis de ce facteur décolorant.

Enfin, l'acide acétique a probablement aussi une action antagoniste vis-à-vis de la décoloration par le zincate de potasse. Il est intéressant de remarquer à ce point de vue que le précipité produit dans les tubes contenant l'eau ou l'urine, additionnés l'un et l'autre de zincate, est beaucoup plus abondant lorsqu'on leur ajoute l'alcool *acétique* que lorsqu'on leur ajoute l'alcool *seul*.

b) *Alcool seul.* — L'étude de la rapidité de décoloration dans des mélanges de solutions alcalines, avec ou sans H^2O^2, additionnées de phénolphtaléine et, comparativement, d'alcool acétique ou d'alcool seul, nous a montré que l'alcool seul, bien que doué d'un certain pouvoir antagoniste, vis-à-vis de la décoloration par la forte alcalinité ou par H^2O^2, a un pouvoir cependant moins intense à ce point de vue que l'alcool acétique.

De même, en ce qui concerne le pouvoir décolorant de l'urine en milieu fortement alcalin et du zincate de potasse.

Il n'est donc pas étonnant que l'alcool seul soit moins actif que l'alcool acétique au point de vue de la rapidité d'apparition de la réaction de Meyer et de la stabilité de la coloration.

Nous nous dispensons de rapporter ici le détail des multiples réactions qui nous ont amené à cette conclusion.

c) *Alcool acétique.* — L'action de l'alcool acétique nous paraît donc maintenant se comprendre très simplement comme représentant la totalisation des actions de l'acide acétique seul et de l'alcool seul, antagonistes à des degrés divers vis-à-vis des facteurs de la décoloration.

IV. — De quelques modifications du réactif de Meyer

L'importance de certains des facteurs de décoloration, inhérents à la composition du réactif de Meyer originel lui-même, nous a amené à nous demander si le réactif ne serait pas avantageusement modifié en augmentant sa teneur en phénolphtaline et en diminuant, au contraire, sa concentration en potasse et en zincate.

Un fait est bien certain, c'est que si l'on augmente la concentration en potasse et en zinc du réactif, tout en augmentant sa teneur en phénolphtaline, on obtient un réactif moins sensible que le réactif originel.

La formule du réactif de Meyer originel étant:

Phénolphtaléine	2 grammes
KOH	20 grammes
Eau	100 cc.
Zinc	10 grammes

le réactif, de la formule suivante, que nous avons essayé, est nettement moins sensible:

Phénolphtaléine	5 grammes
KOH	30 grammes
Eau	100 cc.
Zinc	15 grammes

D'autre part, on ne peut pas trop diminuer la proportion de potasse du réactif de Meyer, car alors la réduction de la phtaléine ne se fait pas, ou ne se fait que très lentement, et la proportion de zincate formé devient plus grande, vu l'ébullition prolongée nécessaire à la réduction. C'est ainsi qu'un réactif contenant, toutes choses égales d'ailleurs, 5 grammes de potasse pour 4 grammes de phtaléine ne se réduit pas même à l'ébullition; avec 10 gr. de KOH pour 4 gr. de phtaléine, la réduction arrive à se faire, mais avec un retard marqué; le réactif ainsi obtenu est inférieur au Meyer originel.

Nous avons essayé, comparativement avec le réactif de Meyer originel, des réactifs ayant respectivement les formules suivantes:

1er Réactif	Phénolphtaléine	4 gr.	2e Réactif	Phénolphtaléine	6 gr.
	KOH.	20 gr.		KOH.	20 gr.
	Eau	100 gr.		Eau	100 gr.
	Zinc	15 gr.		Zinc	15 gr.

Le premier de ces réactifs, essayé dans la réaction de Meyer originelle ou de Meyer modifiée par Telmon, s'est montré nettement plus sensible que le réactif de Meyer lui-même.

Le deuxième réactif s'est, au contraire, montré moins sensible: c'est sans doute que la réduction de sa proportion élevée de phtaléine (6 gr.) s'est accompagnée de la formation d'une notable quantité de zincate, dont on sait le pouvoir décolorant.

Dans le premier réactif, nous avons utilisé une proportion de zinc élevée (15 gr. au lieu de 10 gr. dans le Meyer originel); il est à peu près certain que nous aurions eu intérêt, au contraire, à réduire ce chiffre et que nous aurions évité ainsi la formation de zincate en excès.

Nous avons, actuellement, des recherches en cours dans ce sens, étudiant des réactifs composés approximativement de la façon suivante :

Phénolphtaléine	4 gr.
KOH	20 gr. ou < 20 gr., mais > 10 gr.
Eau	100 gr.
Zinc.	10 gr. ou < 10 gr.

Nous pensons que c'est avec des réactifs de ce genre que nous pourrons obtenir les réactions les plus sensibles.

Enfin, le produit de réduction de la phénolphtaléine, la *phénolphtaline,* étant chimiquement bien connu et isolé et facile à se procurer dans le commerce, nous avons l'intention de préparer le réactif de Meyer en partant directement de la phénolphtaline, afin d'éliminer complètement le zincate des réactions, étant donnée son importance dans le mécanisme de la décoloration.

V. — Activité peroxydasique (vis-a-vis du réactif de Meyer) du fer hématique suivant la complexité de sa combinaison moléculaire.

Nous avons dit plus haut comment nous avions été amené à comparer, au cours de l'étude d'une action hématinisante possible de l'alcool acétique, l'activité peroxydasique de solutions équimoléculaires d'hémoglobine et d'hématine pures ; la conclusion a été que l'activité peroxydasique du fer, appréciée par la réaction de Meyer est nettement plus grande dans le cas de l'hémoglobine que dans le cas de l'hématine, c'est-à-dire que la complexité de la combinaison moléculaire du fer est en raison directe de son activité peroxydasique. Partant de ce fait, nous rappelant aussi les travaux de Gabriel Bertrand sur l'activité

biologique du manganèse en rapport avec sa complexité moléculaire, nous nous sommes demandé si l'hémoglobine vivante, fixée sur le globule rouge, ne serait pas plus active encore, au point de vue peroxydasique, que l'hémoglobine artificiellement isolée et préparée chimiquement. Afin d'étendre le champ de comparaison entre l'activité du fer à l'état d'hématine, forme moléculaire *relativement* simple, et à l'état de combinaisons plus complexes et de plus en plus proches de sa forme biologique, vivante à proprement parler, nous avons fait une série d'expériences consistant à comparer entre elles les activités peroxydasiques : 1° de l'hématine, 2° de l'hémoglobine chimiquement isolée, 3° du globule rouge lavé, c'est-à-dire dépourvu de toute trace de plasma, 4° du même globule rouge lavé, mais laqué ensuite dans l'eau distillée, 5° du sang défibriné *non* laqué, 6° du sang défibriné laqué, 7° du sang *total non* laqué, 8° du sang *total* laqué, 9° du sang défibriné soumis à l'action de solutions alcalines fortement hématinisantes.

Toutes les solutions étudiées étaient prises comparables entre elles au point de vue de leur teneur en hématine, donc en fer. Pour les solutions d'hématine et d'hémoglobine, nous avons vu qu'il fallait prendre, à ce point de vue, des solutions équimoléculaires. Pour les dilutions de sang ou de globules devant correspondre au point de vue de leur teneur en fer aux précédentes, nous avons supposé que les sangs utilisés contenaient 20 p. 100 d'hémoglobine, chiffre certainement au-dessus du chiffre réel ; les solutions ainsi préparées étaient donc en réalité moins riches en fer que les solutions d'hémoglobine et d'hématine chimiquement isolées. Si donc, dans ces conditions, les dilutions de sang ou de globules se montraient plus actives, au point de vue peroxydasique (et même après chauffage), que les autres, c'est que leur activité devait être bien supérieure

à celle de ces dernières. Or, c'est justement ce que nous avons constaté.

1° Comparaison de l'activité peroxydasique de solutions équimoléculaires d'hématine, d'hémoglobine et de dilutions de sang frais correspondant à un taux hématinique certainement inférieur à celui des solutions précédentes.

α *Préparation des solutions équimoléculaires d'hématine et d'hémoglobine.* — On dissout 1 milligramme (1) d'*hémoglobine* pure, cristallisée, de cheval, dans 50 cc. d'eau distillée, ce qui donne une solution d'hémoglobine à 1/50.000. D'autre part, on a une solution mère d'*hématine* pure à 1 milligramme (1) pour 150 cc. d'alcool acétique à 2 p. 100.

Le calcul montre que 1 milligramme d'hématine correspond à 0 milligr. 0345 (2) d'hématine, et que ces 0 milligr. 0345 d'hématine sont contenus dans 5 cc. 175 de la solution d'hématine à 1 milligramme pour 150 cc.

Pour obtenir donc une solution d'hématine équimoléculaire à la solution d'hémoglobine à 1 milligramme pour 50 cc., on fait une solution dans l'alcool acétique contenant 5 cc. 175 (pratiquement 5 cc. 18) de la solution primitive d'hématine pour un volume total de 50 cc. On a ainsi finalement les deux solutions équimoléculaires, l'une d'*hémoglobine dans l'eau distillée,* l'autre d'*hématine dans l'alcool acétique.*

On aurait pu, pour avoir, SEMBLE-T-IL, des solutions d'hématine et d'hémoglobine plus comparables, dissoudre l'hé-

(1) Pesée faite à la balance de Curie.

(2) *Hémoglobine* (cheval) $\overline{C^{712}H^{1130}Az^{214}O^{245}S^{2}Fe}$ *Hématine* $\overline{C^{32}H^{32}Az^{4}O^{4}Fe}$

1 gr. hémoglobine correspond à 35 mgr. 4 d'hématine.

moglobine d'une part et l'hématine de l'autre dans des solutions alcalines identiques. Mais dans ces conditions étant donnée l'action hématinisante des solutions alcalines sur l'hémoglobine, on aurait eu, au contraire, d'une part, une solution composée d'un mélange de globine et d'hématine (et peut-être d'hémoglobine non décomposée) et, d'autre part, une solution d'hématine. La dissolution de l'hématine et de l'hémoglobine dans des solutions alcalines identiques aurait donc introduit une cause d'erreur de premier ordre.

Au contraire, en dissolvant l'hémoglobine dans l'eau distillée, on ne la décomposait pas; d'autre part, il était facile, en effectuant la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique à la fois sur la solution d'hémoglobine et sur la solution d'hématine, de rendre dans les deux cas les mélanges absolument comparables en ajoutant à 3 cc. de la solution d'hématine dans l'alcool acétique 3 cc. d'eau distillée et en ajoutant à 3 cc. de la solution d'hémoglobine dans l'eau distillée 3 cc. d'alcool acétique. Il suffisait ensuite, pour déclancher les réactions, d'ajouter dans chaque mélange 1 cc. de réactif de Meyer et le nombre approprié de gouttes d'eau oxygénée.

6 *Préparation des dilutions de sang* TOTAL *frais de chien, correspondant à un taux hématinique certainement inférieur à celui des solutions précédentes.* — Comme nous l'avons dit précédemment, on prépare ces dilutions en supposant que le sang utilisé contienne 20 p. 100 d'hémoglobine, pour avoir des solutions à titre hématinique certainement *inférieur* à celui des solutions hémoglobinique et hématinique précédemment préparées.

20 gr. d'hémoglobine sont contenues dans 100 cc. de sang frais, 1 gr. d'hémoglobine est contenu dans 5 cc. de sang frais.

On prend donc un poids de sang cinq fois plus grand que le poids d'hémoglobine de la solution précédemment préparée, c'est-à-dire 5 milligrammes de sang pour 50 cc., ou 5 grammes de sang pour 50.000 cc., ce qui revient à faire une *dilution de sang à* 1 *p.* 10.000. Le sang utilisé est du sang total de chien [1] (nous disons *total* et non « défibriné »).

On fait deux prises de sang à l'artère fémorale dans deux verres séparés et on mesure dans chacun d'eux, immédiatement après la prise, 1 cc. de sang avec une pipette propre à chaque échantillon. On dilue instantanément le centimètre cube mesuré, dans 1.000 cc. d'eau distillée d'une part, dans 1.000 cc. d'eau salée à 9 p. 1.000 d'autre part. On homogénéise instantanément chaque mélange par une agitation active, afin d'éviter toute trace de coagulation. On part de chacune de ces solutions à 1 p. 1.000 pour obtenir les solutions au 1/10.000e, respectivement dans l'eau salée et l'eau distillée.

γ *Réactions comparatives avec les diverses solutions.* — Afin de rendre les épreuves absolument comparables entre elles, on mélangeait préalablement la dilution hématique avec l'alcool acétique et le réactif de Meyer et on agitait chaque tube à essai. On versait ensuite rapidement, dans chacun des tubes à essais, I goutte d'eau oxygénée, puis une nouvelle série de gouttes, versées toujours une par une dans chaque tube, jusqu'à arriver au nombre définitif de IV gouttes d'eau oxygénée par tube.

Les réactions effectuées ont été les suivantes :

---

(1) Ce chien de 10 kilogrammes venait d'être chloralosé par injection intraveineuse de 80 cc. de chloralose (à 1 p. 100 dans l'eau salée), ce qui diminuait encore, pour un volume de sang donné, la richesse hémoglobinique de ce sang, par rapport à son sang *normal*.

1.	Hématine	Solution d'*hématine* équimoléculaire dans l'alcool acétique	3 cc.	Coloration *rose lilas*.
		Eau distillée	3 cc.	
		Réac. de Meyer	1 cc.	
		H^2O^2	IV gouttes	
2.	Hémoglobine	Solut. d'*hémoglobine* équimoléc. dans l'eau distillée	3 cc.	Coloration *rouge fuchsine* intense, *infiniment* plus marquée que la précédente.
		Alcool acétique	3 cc.	
		R. Meyer	1 cc.	
		H^2O^2	IV gouttes	
3.	Sang laqué	Dilution de sang *total* frais de chien dans l'eau *distillée*, à 1 p. 10.000	3 cc.	Coloration *très nettement plus intense* que la *précédente*.
		Alcool acétique	3 cc.	
		R. Meyer	1 cc.	
		H^2O^2	IV gouttes	
4.	Sang *non* laqué	Dil. de sang *total* frais de chien dans l'eau *salée*, à 1 p. 10.000	3 cc.	Coloration tout à fait *analogue* à la précédente.
		Alcool acétique	3 cc.	
		R. Meyer	1 cc.	
		H^2O^2	IV gouttes	
5.	Témoin	*Eau distillée*	3 cc.	Tardivement, coloration *rose*, extrêmement *pâle passagère*, nettement moins marquée que pour le n° 1.
		Alcool acétique	3 cc.	
		R. Meyer	1 cc.	
		H^2O^2	IV gouttes	

La conclusion est bien nette : l'activité peroxydasique de l'hématine chimiquement isolée est infiniment moins intense que celle d'une dose correspondante d'hémoglobine chimiquement isolée ; d'autre part, l'activité peroxydasique de cette dernière est, à son tour, nettement moins marquée que celle de l'hémoglobine du sang

frais laqué ou non laqué (le laquage ne semblant pas modifier appréciablement cette activité.

De plus, les mêmes réactions que les précédentes, effectuées sur les dilutions d'hématine, d'hémoglobine et de sang CHAUFFÉES (ébullition), donnent entre elles des résultats exactement de même sens et d'ailleurs sans différence *pratiquement* bien appréciable avec les résultats obtenus dans le cas des solutions non chauffées.

Des résultats exactement de même nature ont été obtenus en opérant sur des solutions dix fois plus diluées que les précédentes (c'est-à-dire, pour les sangs, sur des dilutions à 1 *p.* 100.000).

2° Comparaison de l'action peroxydasique de dilutions de sang frais, total ou défibriné, laqué ou non laqué, de dilutions de globules lavés, laqués ou non laqués et de sang fraîchement hématinisé.

Dans une seconde série de réactions, nous avons comparé l'activité peroxydasique du sang *total* laqué et non laqué, du sang défibriné laqué et non laqué, des globules lavés laqués et non laqués et du sang préalablement soumis à l'action d'une solution de potasse à 10 p. 100 (volume égal de sang et de solution de potasse) et fortement dilué ensuite dans l'eau distillée; cette dernière dilution était d'ailleurs comparée à une dilution de sang faite en mélangeant un même volume de sang à une solution de même alcalinité que la sienne et de même volume (en d'autres termes, pour l'une de ces deux dilutions, le sang avait été préalablement soumis à l'action d'une très forte alcalinité, et pour l'autre, il n'était soumis qu'à l'alcalinité beaucoup plus faible de la dilution définitive).

Dans cette série de réactions, nous avons opéré sur du sang de *lapin*. Nous nous étions préalablement assuré, pour pouvoir mettre en parallèle les résultats des réactions précédemment effectuées sur le sang de *chien*, que des dilutions à 1 p. 100.000 du sang du même chien et du sang de lapin qui allait servir à notre nouvelle série donnaient entre elles des réactions colorées pratiquement identiques avec le réactif de Meyer en présence d'alcool acétique.

α *Préparation des dilutions sanguines.* — Sur un lapin, on fait, par la carotide, d'abord deux prises de sang isolées, dans deux verres : dans chaque verre on prélève, avec une pipette (pipette différente pour chaque prise), 1 cc. de sang qu'on dilue instantanément d'une part dans 1 litre d'*eau distillée*, d'autre part dans 1 litre d'*eau salée*. On obtient ainsi deux solutions mères, l'une de *sang total laqué*, l'autre de *sang total non laqué*, chacune à 1 p. 1.000.

En second lieu, on fait, sur le même lapin, et immédiatement après les prises précédentes, une nouvelle prise de sang plus abondante (20 cc. environ), qu'on défibrine. Le sang, une fois défibriné, est filtré sur papier.

Dans ce sang défibriné, on fait les prises successives suivantes :

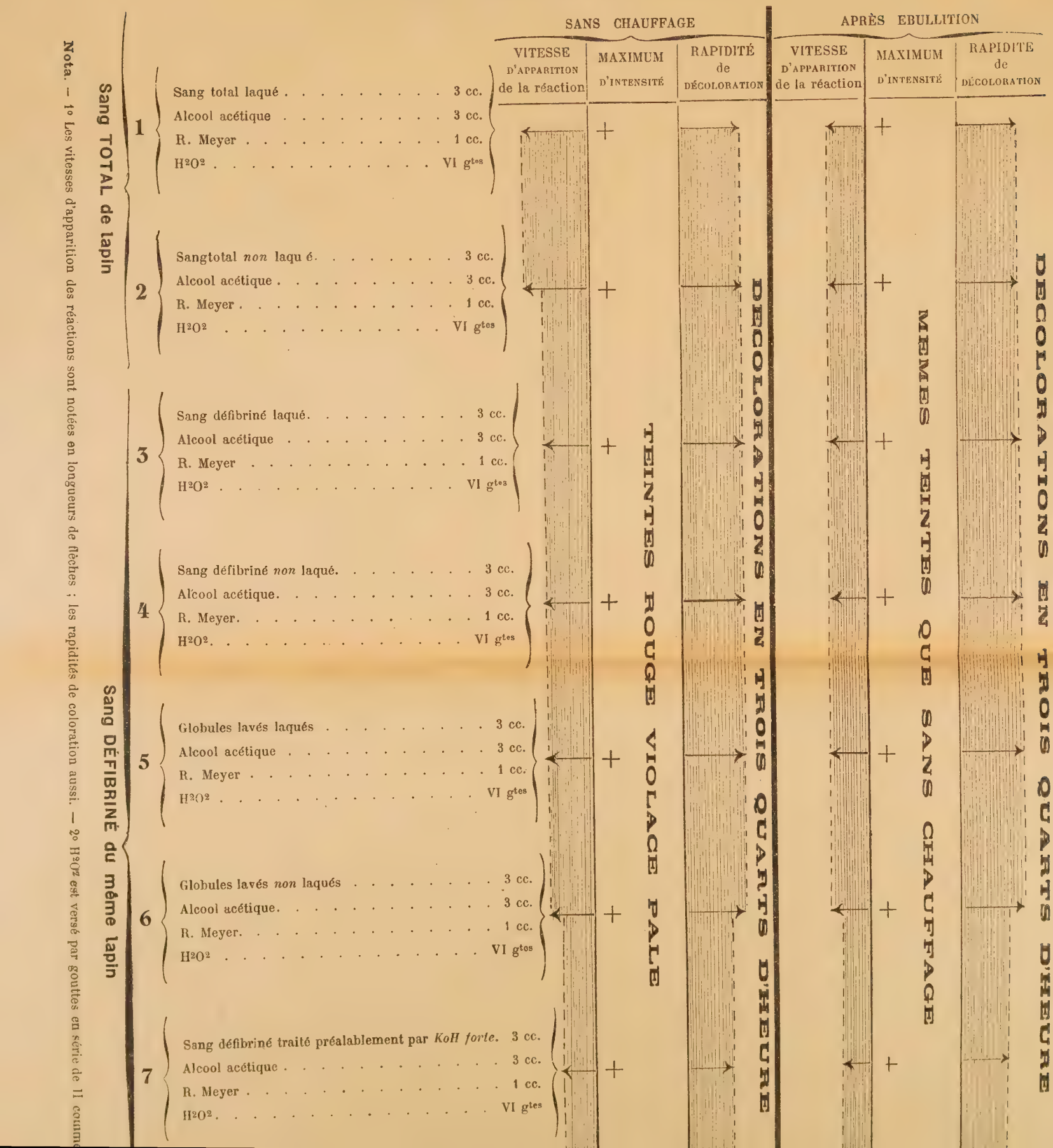
1° 1 cc. de sang est dilué dans 1 litre d'eau distillée : ce sera la solution mère de *sang défibriné laqué* à 1 p. 1.000.

2° 1 cc. de sang est dilué dans 1 litre d'eau salée : ce sera la solution mère de *sang défibriné* NON *laqué* à 1 p. 1.000.

3° 1 cc. de sang est centrifugé dans 10 cc. d'eau salée à 9 p. 1.000, et, par centrifugation et lavages successifs dans l'eau salée, on obtient finalement les globules lavés correspondant à ce centimètre cube de sang. On a bien soin que la centrifugation soit chaque fois aussi *totale* que possible, en s'assurant que le liquide surmontant le culot est

RÉACTIONS COMPARATIVES AVEC LES DIVERSES SOLUTIONS

Toutes les dilutions sont à 1 p. 100.000



Nota. — 1° Les vitesses d'apparition des réactions sont notées en longueurs de flèches ; les rapidités de coloration aussi. — 2° H^2O^2 est versé par gouttes en série de 11 comme

absolument limpide et incolore. Une fois les globules bien lavés, on les dissout dans de l'eau distillée, on lave le tube à centrifugation dans de l'eau distillée jusqu'à ce que celle-ci ait bien entraîné toute trace globulaire et, finalement, après avoir mélangé le liquide de dissolution globulaire et ces derniers liquides de lavage, on en complète le volume avec de l'eau distillée, à 1.000 cc. : ce sera la solution mère de *globules lavés dissous dans l'eau distillée, à* 1 *p.* 1.000, ou *globules lavés laqués.*

4° On lave, identiquement, et avec les mêmes soins, les globules de 1 cc. de sang défibriné dans l'eau salée ; puis, au lieu de les dissoudre dans 1 litre d'eau distillée, on les met en suspension dans 1 litre d'eau salée à 9 p. 1.000, en prenant les mêmes précautions que précédemment pour éviter la moindre perte globulaire : ce sera la solution mère de *globules lavés non laqués, à* 1 *p.* 1.000.

5° 1 cc. de sang défibriné est mis en contact pendant 1 heure et demie avec une solution de KOH à 10 p. 100. Le mélange prend immédiatement une très forte coloration brun rouge. On a soin de l'agiter de temps en temps. Le mélange est ensuite additionné d'eau distillée jusqu'à un volume total de 1.000 cc. : ce sera la solution mère de *sang défibriné traité préalablement par la potasse forte,* solution mère à 1 p. 1.000.

6° 1 cc. de sang défibriné est dilué dans 1 litre d'eau distillée préalablement additionnée de 1 cc. de potasse à 10 p. 100 pour 1.000 cc. d'eau : ce sera la solution mère de *sang défibriné en dilution alcaline faible,* solution mère à 1 p. 1.000. L'alcalinité en potasse de cette dilution elle-même est, on le voit, de 0 gr. 1 p. 1.000.

Avec les diverses dilutions ainsi obtenues, à la fois de sang *total* et de sang *défibriné,* on prépare des solutions à 1 p. 100.000 (10 cc. de solution mère pour un volume total

de 1.000 cc.), sur lesquelles on effectue les réactions suivantes :

Les résultats de cette série de réactions peuvent, comme le montre le tableau qui précède, se grouper de la façon suivante :

1° *Pratiquement,* il n'y a pas de différence vraiment appréciable entre le pouvoir peroxydasique du *sang hémolysé* et du même *sang non hémolysé,* qu'il s'agisse de sang total, de sang défibriné ou de globules lavés. (Pour donner cependant, avec toute la rigueur scientifique désirable, le résultat de nos observations, nous devons dire qu'il nous a semblé observer, pour les tubes portés à l'ébullition, des réactions très légèrement moins intenses dans le cas des sangs *non* hémolysés que dans le cas des sangs hémolysés. Mais les différences dont il s'agit sont vraiment par trop minimes pour que nous croyions pouvoir conclure.)

2° L'activité peroxydasique du *sang total* ne diffère que légèrement de celle du *sang défibriné* ou de celle des *globules lavés:* elle est seulement un peu plus *rapide* que ces dernières, ainsi que le montre la vitesse d'apparition de la réaction; cette différence de rapidité nous semble devoir être attribuée à un autre facteur qu'à l'hémoglobine, puisqu'on ne la retrouve plus après chauffage du sang. D'ailleurs, les *maxima d'intensité* de réaction dans le cas du sang total, du sang défibriné et des globules lavés arrivent à être les mêmes.

3° L'activité peroxydasique du *sang défibriné traité préalablement par la potasse forte* et du sang *défibriné en dilution alcaline faible* se manifeste moins rapidement que pour les dilutions sanguines précédentes, particulièrement si elles ont été chauffées. Elles arrivent cependant au même maximum d'intensité que les précédentes, mais sont un

peu plus résistantes à la décoloration, qu'elles aient été chauffées ou non.

γ *Activité peroxydasique de l'hématine ancienne, isolée chimiquement, et de l'hématine néoformée, non isolée de la solution où elle a pris naissance.* — En somme, dans ces dilutions, en particulier dans la dilution de sang défibriné traité préalablement par la potasse forte (réaction n° 7), où l'hématinisation nous paraît devoir être à peu près totale, on constate que l'activité peroxydasique est pratiquement tout à fait analogue à celle des précédents échantillons de sang non hématinisés préalablement. Or, toutes les dilutions que nous avons utilisées sont comparables, nous le répétons, aux solutions équimoléculaires d'hémoglobine et d'hématine antérieurement employées; elles sont même, nous avons dit pourquoi, certainement moins riches en fer que ces dernières: et malgré cela nous constatons (après avoir montré qu'on peut passer d'une série de réactions à l'autre) que, pour la dilution sanguine où l'hématinisation est complète, l'activité peroxydasique est INFINIMENT plus intense que pour la solution d'hématine chimiquement isolée. C'est sans doute que, dans ce dernier cas, l'hématine a subi une transformation moléculaire la rendant moins apte à la réaction peroxydasique et que l'hématine de la dilution sanguine, récemment hématinisée, doit sa plus grande activité au fait de sa formation récente et à l'absence de manipulations nécessitées par l'isolement chimique de l'hématine.

En somme, *il y a hématine et hématine:* l'hématine chimiquement isolée et artificiellement préparée serait, vis-à-vis de l'hématine non isolée de sa solution (hématine de formation récente), ce que certaines substances chimiquement isolées sont vis-à-vis de ces mêmes substances existant à l'état naissant.

Dans ces conditions, quand nous avons, à propos de la recherche du mécanisme d'action de l'alcool acétique par hématinisation possible, montré l'action sensibilisante de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer faite sur une *hématine chimiquement isolée,* nous ne sommes pas parti d'une hématine comparable à celle qui résulterait de l'action *immédiate* d'un agent hématinisant; l'hématine utilisée était, de par son mode de préparation et de par sa conservation, certainement très différente de la forme plus biologique sous laquelle elle doit exister au moment où elle prend naissance sous l'influence d'un agent hématinisant.

Il y avait donc lieu de *refaire l'expérience de la sensibilisation, par l'alcool acétique, d'une solution alcaline d'hématine en partant non plus d'une hématine ancienne et chimiquement isolée, mais d'une hématine récente et non séparée du milieu où elle a pris naissance,* en opérant soit sur une dilution de sang soumis préalablement à l'action de la potasse forte, soit sur une urine hématique soumise elle aussi à l'action de la potasse forte. Disons de suite que, même dans ces conditions, l'ACTION SENSIBILISANTE DE L'ALCOOL ACÉTIQUE PERSISTE DES PLUS NETTES. Voici, par exemple, une réaction effectuée comparativement, avec et sans alcool acétique, sur une urine hématique préalablement soumise à l'action de la potasse forte.

1	Urine hématique (forte dilution sanguine)	2 cc.	Réaction absolument négative.
	+ 1/2 pastille de potasse.		
	Réactif de Meyer	cc. 1	
	H^2O^2	V gouttes	
2	Même urine	3 cc.	Réaction nettement positive (rouge).
	+ 1/2 pastille de potasse.		
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réactif de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V gouttes	

3	Même urine + 1/2 pastille de potasse.	3 cc.	Réaction négative
	Eau distillée	3 cc	
	Réactif de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V gouttes	
4	Même urine	3 cc	Réaction négative.
	Alcool acétique	3 cc.	
	Réaction de Meyer	1 cc.	
	H^2O^2	V gouttes	

Mais si l'on veut pousser plus loin l'analyse des faits pouvant expliquer la différence d'activité peroxydasique entre l'hématine ancienne isolée chimiquement et l'hématine des solutions de sang récemment hématinisé, on découvre encore d'autres facteurs que l'hématine elle-même pouvant intervenir pour expliquer la différence d'activité peroxydasique des deux hématines.

Dans les dilutions de sang récemment hématinisé, si l'on a affaire à du sang total ou à du sang défibriné, on a, en solution, à côté de l'hématine, les matières albuminoïdes du plasma ou du sérum, la *globine* provenant de la décomposition de l'hémoglobine et les stromas globulaires désagrégés. Si l'on a affaire à des globules lavés au lieu de sang défibriné ou total, on n'a plus les matières albuminoïdes du plasma ou du sérum, mais il reste encore, à côté de l'hématine néoformée, la *globine* et les stromas globulaires. Or, *a priori,* rien ne dit que ces dernières substances soient sans influence sur l'activité peroxydasique de l'hématine. S'il nous est cependant permis de formuler une opinion qui ne se base point directement sur des faits expérimentaux, nous ne pensons pas que cette globine ni les stromas désagrégés puissent avoir une action de ce genre, car ils sont dépourvus de fer et, d'autre part, l'action possible de peroxydases leucocytaires ou sériques n'a pas à

intervenir puisque la dilution de sang traitée préalablement par la potasse forte arrive à avoir pratiquement la même intensité après chauffage qu'avant.

Donc, d'ores et déjà, nous croyons pouvoir conclure que l'*hématine néoformée et non isolée de la solution où elle a pris naissance a un pouvoir peroxydasique infiniment plus intense que l'hématine ancienne chimiquement isolée* (1).

D'ailleurs, nous avons l'intention de poursuivre plus loin ces recherches: on peut, en effet, comparer l'activité peroxydasique de solutions alcalines d'hématine ancienne chimiquement isolée, d'un mélange d'hématine ancienne et de globine, d'un mélange d'hématine néoformée et de globine, enfin d'hématine néoformée sans globine ni autres impuretés. De même, on peut comparer l'activité peroxydasique d'un sang traité par la potasse forte, après des temps plus ou moins éloignés de son hématinisation initiale.

VI. — Des modifications apportées dans les résultats cliniques de la réaction de Meyer par les moyens de sensibilisation étudiés.

L'augmentation remarquable de la sensibilité de la réaction de Meyer, réalisée par l'addition d'alcool acétique ou d'autres alcools-acides et par un optimum déjà étudié par nous de proportion d'alcool, permet de déceler la présence du sang dans de nombreuses urines où la réaction

(1) Ce fait est à rapprocher du fait qu'on n'a jamais pu obtenir des cristaux de chlorhydrate d'hématine (hémine) en partant de l'hématine préparée chimiquement. Les affinités chimiques de cette dernière semblent donc infiniment moins développées que celle de l'hématine naissante ou néoformée et non isolée du milieu où elle a pris naissance.

de Meyer originelle donnait des résultats absolument négatifs.

Des hématuries ou des hémoglobinuries extrêmement faibles deviennent décelables. Le fait est très important dans les néphrites, où la quantité de sang de l'urine est quelquefois minime et passe inaperçue, alors que, si elle était révélée, elle pourrait être la source d'indications thérapeutiques très fécondes. On peut en dire de même en ce qui concerne le diagnostic de l'hématurie chez les lithiasiques ou plutôt chez les malades atteints de diathèses lithiasiques, chez lesquels cependant un exercice violent ou une marche peut provoquer le passage dans l'urine d'une quantité de sang qui, pour n'être quelquefois que très minime, n'en reste pas moins un élément des plus importants et des plus nécessaires à connaître.

De même encore pour les hématuries minimes des tuberculoses rénales au début, des tumeurs malignes du rein, dans lesquelles, bien avant qu'apparaisse l'hémorragie spontanée et abondante classique et que le malade, suivant l'expression très heureuse de Guyon, « voie son hématurie », existent néanmoins des traces d'abord, puis des quantités plus appréciables de sang mais peu abondantes, pour la diagnose desquelles les procédés de sensibilisation de la réaction de Meyer seront extrêmement précieux.

Mais c'est surtout dans le cas des urines purulentes qu'il y a lieu d'insister sur les résultats différents, plus vrais, que donnent les procédés de sensibilisation de la réaction de Meyer comparativement avec la réaction de Meyer originelle. C'est une donnée généralement admise aujourd'hui en chimie-clinique que le pus urinaire ne donne pas la réaction de Meyer! (1) Pour être exact, di-

(1) Récemment encore Feuillée disait à la Société de biologie que le pus urinaire ne donnait pas la réaction de Meyer.

sons plutôt qu'il ne donne pas la réaction de Meyer originelle, car on se rappelle les diverses conditions que nous avons bien précisées et dans lesquelles le pus urinaire est susceptible de donner la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique; d'ailleurs, nous rappelons à dessein encore qu'il y a lieu de tenir compte, dans l'interprétation des résultats positifs de cette dernière réaction, de la part du globule rouge ou de l'hémoglobine et de la part des peroxydases leucocytaires, sériques ou bactériennes, et de la part due aussi au développement progressif des peroxydases prenant naissance au cours de l'altération du pus pendant la conservation de l'urine plus ou moins longtemps après son émission.

Une autre conséquence, susceptible de modifier peut-être beaucoup les résultats cliniques de la réaction de Meyer et des déductions théoriques pathogéniques qu'on a cru pouvoir en tirer au point de vue de la classification des néphrites, est la suivante. D'après G. Paisseau et L. Tixier, la réaction de Meyer (originelle) serait constante dans certaines variétés de néphrites, dont la néphrite scarlatineuse est le type, tandis qu'on ne la retrouverait pas dans la néphrite diphtérique, même avec des quantités considérables d'albumine. Il en serait de même au point de vue expérimental pour la néphrite cantharidienne d'une part, et pour la néphrite uranique, d'autre part: d'où possibilité d'une distinction entre les *néphrites congestives* et les *néphrites dégénératives*, les premières seules devant donner une réaction de Meyer positive. On entrevoit de suite combien cette distinction sera peut-être inexacte si, au lieu d'utiliser la réaction de Meyer originelle, on utilise la réaction de Meyer sensibilisée par les moyens que nous avons vus. La distinction entre les néphrites congestives et les néphrites dégénératives n'en persis-

tera pas moins, bien entendu, au point de vue clinique; mais, jusqu'à présent, en tout cas, rien ne nous permet de dire de façon catégorique que les néphrites dégénératives ne s'accompagnent pas de la présence du sang dans l'urine, à l'inverse des néphrites congestives, et de nouvelles recherches s'imposent dans ce sens.

Quoi qu'il en soit, ces quelques aperçus de chimie-clinique montrent combien peut se modifier l'interprétation clinique à la lumière d'une réaction sensibilisée. Il est utile de ne point les perdre de vue si l'on veut éviter des erreurs qui peuvent être importantes à la fois au point de vue *pratique* et au point de vue *théorique*.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR UNE NOUVELLE REACTION DU SANG DANS L'URINE ET LES DILUTIONS AQUEUSES DE SANG PAR LA FLUORESCINE

La réaction de Meyer utilisant la réduction et l'oxydation de la plus simple des phtaléines, la phénolphtaléine, il était logique de se demander si d'autres phtaléines (composés résultant de la combinaison de l'acide phtalique avec divers phénols) ne seraient pas utilisables aussi au même point de vue. C'est ce qui a amené M. C. Fleig à reconnaître que la fluorescéine, phtaléine de la résorcine, pouvait être très avantageusement employée pour la recherche du sang dans l'urine ou d'autres milieux organiques, étant donné qu'elle se réduit très facilement en fluorescine et que ce produit de réduction se réoxyde aussi très facilement en donnant la fluorescéine elle-même, dont on connaît le pouvoir fluorescent extraordinairement intense, tout à fait approprié à la faire déceler à la simple inspection dans un liquide quelconque, en particulier dans l'urine.

Nous avons fait de cette réaction à la fluorescine « réaction de Fleig » une étude détaillée, dont nous ne ferons

que résumer ici les principaux points, vu l'analogie qui relie cette réaction à la réaction de Meyer pour plusieurs points.

I. — Mécanisme de la réaction a la fluorescine. — Réactifs. — Technique de son application dans l'urine.

Le mécanisme de la réaction à la fluorescine étant absolument calqué sur celui de la réaction à la phénolphtaline, nous renvoyons à ce que nous avons dit au sujet de cette dernière, sans insister davantage.

Le réactif à la fluorescine se prépare en dissolvant 0 gr. 50 de fluorescéine dans 100 cc. d'eau distillée, additionnée de 15 ou 20 gr. de potasse caustique, et en mélangeant au tout 10 gr. de zinc en poudre impalpable; la réduction de la fluorescéine s'opère déjà partiellement à froid; il suffit de porter le tout une minute à l'ébullition pour obtenir une réduction complète.

Si l'on doit se servir de suite du réactif, on peut le filtrer chaud; si le réactif doit être conservé, il est nécessaire de le conserver en présence d'un excès de zinc pour empêcher son oxydation (1). Si, malgré cela, le réactif s'était partiellement réoxydé, ce qu'on reconnaît facilement à sa légère fluorescence, il suffirait de l'agiter un moment en présence de son zinc, de le laisser au repos quelques instants et de n'utiliser, pour les réactions à effectuer, que la couche supérieure, clarifiée, du réactif. Malgré cela, si le réactif est ancien, l'agitation en présence de son zinc ne suffit pas à le réduire; il faut alors soit le porter à nouveau à l'ébullition, soit y ajouter une nouvelle quantité de potasse et de zinc et agiter à nouveau.

---

(1) On conserve aussi très bien le réactif, *sans zinc*, en ayant soin de le maintenir à l'obscurité (flacons en verre jaune, sous boîtes fermées).

Les proportions que nous avons indiquées pour sa préparation sont, après de multiples essais, celles qui nous ont paru les meilleures (1).

Nous avons aussi essayé d'opérer la réduction de la fluorescéine en milieu acide (acide acétique) et toujours en présence de zinc; il eût suffi ensuite, pour obtenir la réaction du sang, d'ajouter le réactif à l'urine hématique en alcalinisant le milieu. Mais cette façon d'opérer nous a paru inférieure à la précédente.

Pour effectuer la recherche du sang dans l'urine, on ajoute à 2 cc. d'urine 0 cc. 25 à 1 cc. de réactif à la fluorescine et III gouttes d'eau oxygénée (à 12 volumes). Pour peu que l'urine contienne de sang, il se produit instantanément une superbe fluorescence, extrêmement nette et d'une observation très facile, surtout si l'on a soin d'observer l'aspect du liquide au moment où tombent les gouttes d'eau oxygénée: on voit, en effet, à ce moment se produire de magnifiques STRIES fluorescentes; si l'on agite très légèrement le liquide, il apparaît un beau nuage fluorescent, dont l'aspect tranche de façon absolue sur la coloration de l'urine, quelle que soit la teinte de celle-ci. Si le tube à essai où l'on effectue la réaction a été agité avec précaution, de façon à ne pas mélanger la couche inférieure du liquide et la couche supérieure, on observe, à la limite des deux, une *bague* fluorescente d'une extrême netteté. C'est dire que la réaction, en même temps que sa simplicité d'exécution et son élégance même, offre les caractères de netteté les plus frappants.

Bien plus, si l'on dilue le liquide d'un grand volume d'eau, la réaction n'en est pas moins apparente, souvent

---

(1) Cependant, un réactif à 0,25 de fluorescéine pour 100 cc. d'eau convient parfaitement aussi.

même au contraire : c'est une façon, en effet, de supprimer la coloration due à l'urine elle-même, et il ne reste plus que la pure fluorescence due à la réaction.

La fluorescence obtenue ne fait d'ailleurs que s'accroître et se stabiliser. Si, dans un tube témoin, on fait le même mélange que précédemment, mais avec de l'eau distillée ou de l'urine normale au lieu d'urine hématique, celui-ci ne se modifie point ; si l'on avait quelque doute, il suffirait de le diluer comme dans les conditions précédentes pour avoir un terme de comparaison absolument concluant.

La réaction est si nette et si intense que si elle ne s'est pas produite, comparativement avec un tube témoin, au bout de 3 minutes au maximum, il faut la considérer comme absolument négative. Le tube témoin, en effet, finit à la longue par prendre une légère fluorescence, loin cependant d'être comparable à celle du tube où la réaction est positive et qui, en conséquence, ne diminue en rien la valeur de la réaction.

II. — Sensibilité de la réaction. — Essais de sensibilisation par l'alcool acétique. — Sensibilité comparée de la réaction de Meyer avec ou sans alcool acétique et de la réaction a la fluorescine, dans des dilutions sanguines, aqueuses et urinaires.

La réaction à la fluorescine est, dans l'urine, *infiniment* plus sensible que la réaction de Meyer originelle, et permet de déceler des proportions de sang de 1/1.000.000 environ.

Contrairement à ce qui a lieu pour la réaction de Meyer originelle, *l'urine n'a qu'un pouvoir empêchant extrême-*

ment minime vis-à-vis de la sensibilité de la réaction à la fluorescine et, pratiquement, on peut dire que la sensibilité de cette réaction est à peu près la même, qu'on opère sur des dilutions aqueuses de sang ou qu'on opère sur des dilutions urinaires.

On peut prévoir dès lors que l'alcool acétique, étant donné son mode d'action vis-à-vis de la réaction de Meyer, n'aura, vis-à-vis de la réaction à la fluorescine, qu'un pouvoir sensibilisateur très faible ou nul. C'est effectivement ce que nous avons constaté.

La réaction à la fluorescine, effectuée sur des dilutions de SANG DANS L'URINE, non seulement n'est pas plus sensible en présence d'alcool acétique que sans alcool acétique, mais même moins sensible que dans le premier cas.

La même réaction, effectuée sur des dilutions AQUEUSES de sang, est, de même, *moins sensible en présence d'alcool acétique sans alcool acétique.* Pour des dilutions aqueuses très fortes de sang (1 p. 1.000.000), l'addition d'alcool acétique donne des réactions plus lentes que sans alcool acétique, mais devenant plus intenses que sans alcool acétique. On pourrait croire alors que, pour ces dilutions très étendues, l'alcool acétique a un certain pouvoir sensibilisant; mais si l'on a soin d'effectuer une réaction témoin en présence d'eau distillée, au lieu de dilutions sanguines, on constate que la réaction témoin est tout aussi intense que l'autre (réaction à blanc). Donc, il est bien vrai que l'*alcool acétique n'augmente pas la sensibilité de la réaction à la fluorescine pour la recherche du sang.*

De plus, soit pour des dilutions *aqueuses* de sang; soit surtout pour des dilutions *urinaires,* la *réaction à la fluorescine sans alcool acétique est nettement plus sensible que la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique.*

Un avantage de la réaction à la fluorescine sur la réac-

tion de Meyer modifiée par Telmon est donc de ne *pas donner de « réactions à blanc »*, puisqu'on n'a pas à employer, pour la sensibiliser, d'alcool acétique qui cause justement ces « réactions à blanc ».

Explication de l'absence de sensibilisation par l'alcool acétique. — Nous avons expliqué que l'alcool acétique sensibilise la réaction de Meyer en agissant vis-à-vis des divers facteurs de décoloration (pouvoir décolorant de l'urine en milieu alcalin, forte alcalinité, H^2O^2, zincate). Or, en recherchant l'action possible de ces divers facteurs vis-à-vis de la fluorescéine par des réactions de même nature que celles que nous avons effectuées pour la réaction de Meyer, nous avons constaté, de la façon la plus nette, que leur action, vis-à-vis de la fluorescéine, pour la plupart d'entre eux, était nulle et ne se manifestait qu'avec le zincate.

Le zincate est donc le seul agent capable d'atténuer la fluorescence due à la fluorescéine. Ce fait nous fait comprendre déjà que l'urine ne possède pas de pouvoir empêchant spécial vis-à-vis de la réaction à la fluorescéine et que, par conséquent, la sensibilité à cette réaction soit à peu près égale pour les dilutions de sang dans l'urine et pour les dilutions de sang dans l'eau distillée. De plus, le zincate étant le seul agent capable de diminuer, dans les conditions de l'expérience, le pouvoir fluorescent, nous avons cherché si l'alcool acétique était susceptible d'empêcher ou de diminuer cette action: or, le résultat s'est montré parfaitement négatif.

Le manque de sensibilisation de la réaction à la fluorescine par l'alcool acétique et l'égale sensibilité de la réaction dans l'urine et dans l'eau distillée s'expliquent par le fait que ni l'H^2O^2, *ni l'alcalinité forte, ni le pouvoir décolorant de l'urine en milieu alcalin ne diminuent la fluores-*

cence de la fluorescéine et que, d'autre part, le seul agent capable d'atténuer cette fluorescence, le zincate de potasse, n'est nullement influencé lui-même par l'alcool acétique.

Il est intéressant de remarquer que l'absence de sensibilisation de la réaction à la fluorescine par l'alcool acétique est tout à fait en rapport avec la conclusion par laquelle nous avons repoussé la possibilité d'un mécanisme par hématinisation pour la sensibilisation par l'alcool acétique dans la réaction de Meyer: *dans les deux cas, en effet, réaction à la phénolphtaline en présence d'alcool acétique et réaction à la fluorescine en présence d'alcool acétique, l'hématinisation est absolument la même, et pourtant la sensibilisation est nulle dans le cas de cette dernière;* la sensibilité même, nous l'avons vu, est diminuée par l'addition d'alcool acétique, ce qui coïncide bien avec le résultat des deux réactions suivantes, dans lesquelles on va voir que l'addition d'alcool acétique à un mélange d'urine et de fluorescéine en milieu fortement alcalin diminue la fluorescence de ce dernier.

1	Urine normale.....	2 cc.	Fluorescence bien moins marquée dans 2 que dans 1.
	KOH à 20 p. 100.....	1 cc.	
	Sol. aq. de fluorescéine.....	II gouttes	
2	Urine normale	3 cc.	
	Alcool acétiq.	3 cc.	
	KOH à 20 p. 100.....	1 cc.	
	Sol. aq. de fluorescéine.....	II gouttes	

III. — Réaction a la fluorescine dans diverses urines pathologiques. — Urines polyuriques. — Urines purulentes.

La réaction à la fluorescine ne nécessitant pas (même pour être plus sensible que la réaction de Meyer modifiée

par Telmon) l'addition d'alcool acétique, n'est jamais sujette à donner, dans une urine ne contenant pas de sang, un résultat positif si cette urine a une densité même très faible, puisque la réaction est négative avec l'eau distillée. C'est donc une cause d'erreur en moins et dont on n'a pas à se préoccuper, tandis que nous avons vu les précautions à prendre en pareil cas pour effectuer la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique. *On n'a donc pas à se préoccuper,* dans ce cas, *de la densité de l'urine.*

Parmi les éléments, autres que le sang, pouvant exister dans les urines pathologiques, aucun n'est susceptible de donner la réaction, sauf le *pus.*

Or, nous avons déjà vu comment devaient être interprétés les résultats obtenus dans les urines purulentes avec la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique. Les mêmes interprétations sont à faire dans le cas de la réaction à la fluorescine, ainsi que les mêmes manipulations permettant de dissocier ce qui, dans le pus, est dû au globule rouge et ce qui est dû aux autres éléments précédemment étudiés.

Les diverses substances médicamenteuses pouvant être éliminées couramment par l'urine n'ont pas d'action spéciale sur la réaction. Si, d'ailleurs, une urine donnait une réaction positive qu'on pût être tenté de rapporter à l'absorption d'un médicament, il serait facile d'éliminer l'action de ce dernier en s'assurant qu'il n'a pas d'influence sur la réaction, laquelle serait effectuée à la fois avec la substance médicamenteuse elle-même et avec la substance employée sous forme d'élimination urinaire.

IV. — Activité peroxydasique du fer suivant la complexité de sa combinaison moléculaire étudiée au moyen de la réaction a la fluorescine.

Nous avons effectué, avec la fluorescine, à quelques variantes près dans la technique, les mêmes réactions dont nous avons donné le détail à propos de l'activité peroxydasique du fer étudiée au moyen de la réaction de Meyer. Les résultats que nous avons obtenus sont exactement de même sens que dans le cas de cette dernière. Aussi nous permettons-nous de ne pas insister davantage sur ce point.

Soulignons seulement, pour montrer l'intérêt biologique général des réactions peroxydasiques effectuées avec les phtalines, que nous avons là une confirmation très importante des faits précédemment observés.

V. — Autres phtalines.

La phénolphtaléine et la fluorescéine ne sont pas les seules phtaléines pouvant être le point de départ de réactions colorées du sang. On sait qu'une propriété très générale des phtaléines est leur facilité de réduction d'une part, la facilité d'oxydation d'autre part de leurs produits de réduction.

Mais le mécanisme de cette oxydation diffère suivant la phtaline considérée. Il réside, pour certaines, dans une peroxydation vraie, c'est-à-dire dans une oxydation nécessitant la présence d'un agent catalytique métallifère (hématine, hydrate de fer colloïdal, etc.) et d'eau oxygénée : c'est le cas de la phénolphtaline et de la fluorescine ; mais, pour d'autres, le mécanisme d'oxydation est moins complexe et

se déclanche, soit simplement au contact de l'eau oxygénée (action catalasique proprement dite), soit plus rapidement encore, sous l'influence du seul contact de l'oxygène atmosphérique (action oxydante banale). C'est ce qui explique que toutes les phtalines ne puissent pas servir de réactif pour la diagnose du sang, ces réactifs en question s'oxydant spontanément, soit en présence d'air seul, soit en présence d'H^2O^2; les réactions qu'on obtiendrait ainsi avec le sang seraient vraiment trop peu spécifiques pour permettre une conclusion quelconque.

Nous avons, avec Fleig, essayé diverses phtaléines ou divers composés dérivés de phtaléines (éosine, rhodamine, érythrosine, galléine, etc.), mais aucune de ces substances ne nous a paru propre à donner un produit suffisamment stable pour qu'il soit possible de l'utiliser comme réactif du sang.

VI. — Intérêt clinique de la réaction a la fluorescine.

La réaction à la fluorescine, en ce qui concerne la recherche clinique du sang dans l'urine, présente les mêmes avantages que la réaction de Meyer sensibilisée par l'alcool acétique, en particulier celui de sa haute sensibilité qui dépasse, nous l'avons vu, celle de cette dernière (1). Son seul désavantage est de nécessiter un réactif dont la conservation est moins commode que celle du réactif de Meyer. Mais cet inconvénient, auquel on peut parer dans une certaine mesure, nous paraît, en revanche, largement compensé par les avantages suivants :

(1) Et permet, comme elle, de déceler la présence de sang *hémolysé* dans l'urine là où le microscope est absolument impuissant à révéler le moindre globule.

1° Sa simplicité et sa rapidité d'exécution et la facilité d'observation du changement de teinte obtenue dans l'urine.

A sensibilité égale et même supérieure à celle de la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique, elle s'effectue beaucoup plus rapidement que celle-ci, puisqu'elle ne nécessite ni l'addition d'alcool acétique, ni, dans les cas douteux, l'examen des différentes réactions en présence de doses variables d'acide acétique et d'alcool (réactions dont nous avons montré l'utilité et même la nécessité dans certains cas pour l'épreuve de Meyer).

Si l'on attache quelque importance au côté frappant et esthétique de la réaction, elle ne le cède en rien à l'élégance de la réaction de Meyer, au contraire. Quant à sa simplicité d'exécution, elle est plus grande encore que celle de la réaction de Meyer, puisqu'on opère sans alcool ni alcool acétique.

2° Son absence de résultats positifs dans des urines polyuriques ne contenant pas de sang.

On a bien présentes à l'esprit les « réactions à blanc » obtenues avec la réaction de Meyer en présence d'alcool acétique dans le cas des urines de très faible densité et l'absence de telles réactions pour la réaction à la fluorescine. Ce fait, en évitant toutes causes d'erreur possible, permet encore une plus grande rapidité d'exécution de la réaction dans le cas d'urines polyuriques, puisqu'on n'a pas alors à modifier l'urine par les moyens que nous avons indiqués par la réaction de Meyer.

3° La stabilité des colorations obtenues en quelques minutes au maximum d'intensité et l'absence de décoloration consécutive.

Rappelons, à ce point de vue, un fait sur lequel nous avons déjà insisté, que l'observation des teintes stables obtenues doit toujours être faite comparativement avec l'aspect d'un tube témoin contenant, au lieu de l'urine à examiner, une même quantité d'eau distillée ou d'urine normale et que cette comparaison offre son maximum de netteté et de sa valeur lorsqu'elle est effectuée dans des tubes auxquels on a ajouté un grand volume d'eau dès que la fluorescine de l'urine hématique a atteint son maximum d'intensité.

4° La possibilité, étant donnée la stabilité de la fluorescence, d'un dosage clinique du sang dans l'urine.

Un tel dosage n'est pratiquement pas possible dans le cas de la réaction de Meyer, en présence ou non d'alcool acétique ; en effet, les teintes obtenues dans ce cas ne sont pas stables ; de plus, elles le sont d'autant moins que l'urine examinée contient moins de sang, et, fait important, la nature des teintes, pour des urines contenant une *même quantité de sang, mais de densité et de coloration urinaire non identiques,* est absolument différente et ne permet donc pas d'établir une échelle comparative entre des urines de teneur hématique différente. Au contraire, dans le cas de la réaction à la fluorescine, les teintes obtenues sont stables et atteignent, en quelques minutes au plus, leur maximum d'intensité. Si, alors, l'urine ayant atteint ce maximum de fluorescence, on la dilue de plus en plus, jus-

qu'au moment où, introduite dans un tube de diamètre et de hauteur déterminés, elle perde sa fluorescence, il est facile, d'après la quantité d'eau ainsi ajoutée, de juger de la quantité de sang de l'urine, d'après une échelle préalablement établie avec des dilutions sanguines connues, *chaque taux de dilution correspondant à un volume d'eau déterminé pour que la dilution en question perde toute fluorescence* (1).

Enfin, les mêmes modifications dans l'interprétation clinique, au point de vue théorique et au point de vue pratique, que nous avons vu précédemment prendre naissance du fait de l'existence d'une réaction plus sensible que la réaction de Meyer à propos de la réaction de sensibilisation à l'alcool acétique, se présentent aussi du fait de l'existence de la réaction à la fluorescine. Nous y renvoyons sans insister davantage.

Nous allons voir maintenant que l'intérêt clinique de la réaction à la fluorescine s'accroît encore par son utilisation pour la recherche du sang dans divers liquides organiques.

---

(1) Il pourrait arriver que la réaction *témoin*, effectuée sur un mélange de [2 cc. d'eau distillée + 1 cc. de réactif de Meyer + H^2O^2] (réaction témoin effectuée en même temps que la réaction sur l'urine hématique), ait donné elle-même une légère fluorescence depuis le moment où elle a été effectuée jusqu'au moment où l'on apprécie la disparition de la fluorescence dans la dilution d'urine hématique. Dans ce cas, on tiendrait compte de cette réaction à blanc (n'existant d'ailleurs pas en pratique) en mesurant aussi, dans un tube calibré comme précédemment, le volume d'eau nécessaire à sa disparition ; il suffirait finalement de retrancher ce volume du volume ajouté à l'urine hématique, pour avoir le volume nécessité exactement par la disparition de la fluorescence due réellement au sang de l'urine.

QUATRIÈME PARTIE

APPLICATIONS DES REACTIONS DE LA PHENOLPHTALINE ET DE LA FLUORESCINE A LA RECHERCHE DU SANG DANS DIVERS MILIEUX ORGANIQUES

Nous avons essayé les réactions à la phénolphtaline et à la fluorescine par la recherche du sang, généralement à l'état de très petite quantité, dans divers liquides organiques, provenant pour la plupart de la clinique de notre maître, le professeur Rauzier. Nous ne parlerons ici que de nos résultats obtenus avec le liquide céphalo-rachidien, le liquide d'ascite, le liquide pleurétique, les produits d'expectoration et, accessoirement, le lait et le sperme.

A cette étude nous rattacherons quelques recherches sur la diagnose du sang dans les fèces, sur celle des taches de sang et sur les réactions obtenues dans des milieux contenant, au lieu d'hémoglobine, la matière colorante du sang de certains invertébrés, l'hémocyanine, dont le rôle physiologique est analogue à celui de l'hémoglobine et qui, comme cette dernière, contient un métal, le cuivre, auquel semblent dévolues les propriétés biologiques de cette substance.

I. — Liquide céphalo-rachidien

Disons de suite que, dans tous les liquides céphalo-rachidiens que nous avons examinés, nous avons toujours obtenu une réaction positive avec la réaction de Meyer sensibilisée par l'alcool acétique et avec la fluorescine. Plusieurs de ces liquides cependant ne permettaient pas de découvrir de globules rouges au microscope et paraissaient de tous points normaux, de sorte qu'il y a lieu de se demander si un liquide céphalo-rachidien, même normal, ne contient pas déjà des traces de sang. Nous nous gardons bien de vouloir donner à ce sujet une conclusion prématurée et nous nous réservons de poursuivre, dans ce sens, de nouvelles recherches.

En tout cas, voici quelques résultats permettant de prévoir l'intérêt pratique qu'on pourra tirer de l'application au liquide céphalo-rachidien des deux réactions étudiées.

La recherche du sang dans un liquide céphalo-rachidien doit se faire : 1° sur le liquide *non* centrifugé ; 2° sur le liquide non centrifugé mais chauffé pour dissocier l'action peroxydasique possible des leucocytes ; 3° sur le liquide centrifugé et sur le culot de centrifugation ; 4° sur le liquide centrifugé et chauffé.

Pour les liquides contenant du sang décelable au microscope, on obtient toujours des réactions très positives, soit avec la réaction de Meyer, soit avec la réaction de Meyer sensibilisée, soit avec la fluorescine. Le chauffage du liquide diminue légèrement l'intensité des réactions.

Le liquide centrifugé donne les mêmes réactions, de façon beaucoup moins intense, lorsque l'hémolyse est faible ; lorsque, au contraire, l'hémolyse est intense, il n'y a que

peu de différence dans l'intensité des réactions du liquide centrifugé et non centrifugé.

Pratiquement, si les réactions obtenues ne sont, dans le cas du Meyer originel ou du Meyer modifié, que d'un rose très pâle, on ne pourra pas conclure, *au point de vue clinique* à la présence du sang. De même si l'on n'obtient avec la fluorescine, qu'une fluorescence infime (étant donnée surtout la possibilité de l'introduction de quelques globules dus à la ponction lombaire). Mais, si on obtient une fluorescence marquée ou une teinte rouge violacé ou plus foncé, surtout sur le liquide chauffé, on concluera avec certitude à la présence du sang.

Ce qui intéresse, en effet, en clinique, ce n'est pas de savoir s'il y a dans un liquide quelques globules extrêmement rares, mais simplement si leur présence est assez importante pour considérer le liquide comme pathologique. Or, les réactions étudiées nous permettent parfaitement une conclusion à ce point de vue. D'ailleurs, les réactions en question peuvent faire l'objet de recherches plus précises concernant un dosage du sang dans le liquide céphalo-rachidien, vu son absence de coloration ou sa très faible coloration.

II. — Liquide d'ascite

Les liquides d'ascite, que nous avons examinés, n'ont donné qu'un résultat négatif pour la réaction de Meyer originelle et que des teintes trop faibles pour permettre de conclure pour la réaction de Meyer modifiée ou de la fluorescine. On n'y voyait, d'ailleurs, pas de globules au microscope.

Le sang est cependant très facilement décelable dans ces liquides, car si on les additionne artificiellement de

petites quantités de globules ou de sang hémolysé, ils donnent les réactions tout comme les autres liquides.

Les liquides ascitiques dont il s'agit, provenant d'ascite d'origine mécanique et devant être considérés comme des transsudats, c'est-à-dire comme produits sans réactions inflammatoires, on comprend très bien l'absence de globules rouges dans les cas de ce genre.

Il va sans dire que les liquides ascitiques, d'origine autre qu'une origine mécanique, notamment ceux des ascites tuberculeuses, néoplasiques ou autres, doivent donner, suivant les cas, des résultats différents; mais, jusqu'à présent, nous n'avons pas eu l'occasion d'effectuer sur eux les réactions étudiées.

III. — Liquide pleurétique

L'examen des liquides de pleurésies, avant centrifugation et après centrifugation, permet de rechercher si le sang est hémolysé ou non, dissociation qui peut avoir une importance au point de vue du diagnostic, l'hémolyse intra-pleurale ayant été indiquée comme un signe de cancer pleuro-pulmonaire.

Dans un liquide pleurétique, nous avons pu, très nettement, obtenir les réactions du sang les plus intenses avant la centrifugation et, au contraire, des réactions absolument négatives sur le liquide centrifugé et séparé de son culot. C'était un liquide citrin, limpide, ne donnant en aucune façon l'impression de contenir du sang.

Le sang se décelait aussi sur le liquide chauffé.

L'absence d'hémolyse, pour ce liquide, était justement très intéressante, puisqu'il était question de poser chez ce malade le diagnostic de cancer de la plèvre.

Lorsqu'on désire rechercher si le sang est hémolysé, il est absolument nécessaire d'effectuer cette recherche le plus tôt possible après la thoracocentèse, une hémolyse pouvant se faire plus ou moins rapidement *in vitro*. Si l'on examine, en effet, le même liquide vingt-quatre heures après, la règle est d'y trouver de l'hémoglobine en solution.

Sur d'autres liquides pleurétiques (clinique du professeur Rauzier), nous avons toujours obtenu les réactions de Meyer sensibilisée et de la fluorescine. Nous n'avons, jusqu'à présent, pas trouvé de liquides pleurétiques ne donnant pas les réactions du sang, ce qui est bien en rapport avec l'idée que toutes les pleurésies sont, histologiquement, hémorragiques.

IV. — Sperme. Salive. Crachats

Le *sperme* ne donne, pratiquement, pas les réactions de Meyer modifiée et de la fluorescine.

La *salive* normale se comporte de même. Mais de très rares globules, pouvant provenir de lésions chroniques, souvent inaperçues, de gingivite suffisent, lorsqu'ils s'y mélangent, à provoquer une réaction positive.

Le sang se décèle très facilement dans les produits d'*expectoration,* alors que le simple examen ne permet pas d'en soupçonner la présence. Ce fait a son importance dans la période qui suit l'hémoptysie constatée des tuberculeux; comme celle-ci, tant qu'elle continue à se produire ou à s'accompagner de réaction congestive locale, entraîne certaines contre-indications (notamment suppression du cacodylate de soude); il est donc utile de savoir exactement à quel moment les crachats cessent d'être chimiquement hémoptoïques.

Il est d'un grand intérêt aussi, au début des affections pulmonaires aiguës s'accompagnant de crachats où la présence du sang est douteuse, d'effectuer la recherche du sang par les réactions sensibles.

V. — Fèces

Les fèces, mêmes normales, de l'homme, chauffées ou non chauffées (après dilution dans 10 à 15 volumes d'eau), donnent déjà la réaction de Meyer et la réaction à la fluorescine, fait dû à la présence des produits de décomposition de la molécule hémoglobinique des produits ingérés par l'alimentation.

VI. — Méconium

Les produits qui, dans les matières fécales de l'homme, donnent la réaction de Meyer, ne sont peut-être pas seulement des produits provenant de l'ingestion alimentaire; le méconium, recueilli chez le nouveau-né, *à la naissance même,* est déjà susceptible de donner des réactions *fortement positives* (avant et après ébullition). Ce dernier fait nous paraît pouvoir s'expliquer par la présence du fer qui, à en juger d'après la forte teneur du foie du nouveau-né en fer, doit exister aussi en proportions très notables dans le méconium.

Dans ces conditions, il n'est pas possible d'appliquer directement, sans modifications, les réactions du sang sur les matières fécales. Pour le moment, nous nous bornons à souligner cette cause d'erreur.

VII. — Les taches de sang envisagées au point de vue médico-légal

Nous avons pu obtenir les réactions de *Meyer* et de la *fluorescine* avec la plus grande netteté sur des taches de sang *datant même de quinze ans,* où le sang devait être totalement hématinisé.

Au point de vue médico-légal, notons que la réaction de Meyer sensibilisée, bien que plus sensible que la réaction de Meyer originelle, est encore moins spécifique. Il faut noter également ce fait important, déjà signalé par Fleig, que « la réaction originelle, utilisée pour la recherche du sang des taches fixées sur un objet, en appliquant contre la tache suspecte un papier buvard imprégné d'un mélange de réactif de Meyer et d'eau oxygénée, on obtient *toujours* une réaction positive, que la tache contienne ou non du sang, fait qui serait bien en faveur d'une spécificité, même relative, de la réaction. Mais si l'on observe le mode d'apparition de la réaction sur l'empreinte réalisée sur le papier, on constate que la réaction commence par la périphérie de l'empreinte pour atteindre progressivement le centre ; pour des empreintes provenant de taches ne contenant pas de sang, la réaction positive est liée à la dessiccation progressive de l'empreinte humide, dessiccation qui se produit de la périphérie vers le centre. Il est facile de constater que la réaction ne se produit pas si l'on a soin d'éviter la dessiccation de l'empreinte en portant immédiatement le papier buvard dans une enceinte fermée, à atmosphère humide. Elle ne se produit *même pas au bout d'un mois* dans un tube maintenu fermé et contenant un mélange de réactif de Meyer, d'eau oxygénée et de papier buvard. »

A l'heure actuelle, avec Labat, Cestan, Sarda et Brunel, il faut admettre que la réaction de Kastle-Meyer, douée d'une grande sensibilité, joue, en clinique et en médecine légale, un rôle supérieur à la réaction à la teinture de gaïac de Van Daën.

Au point de vue pratique, il sera donc toujours utile de traiter les taches suspectes d'être d'origine sanguine par la réaction de Kastle-Meyer. L'absence de coloration pourra constituer une preuve que la tache n'était pas formée de sang, mais la certitude viendra de la constatation des cristaux d'hématine examinés au microscope.

Il y a lieu de faire les mêmes restrictions en ce qui concerne la réaction à la *fluorescine.*

VIII. — Sang hémocyanique des invertébrés

Il nous paraît intéressant, à la fin de ce travail, de signaler la similitude d'action de la réaction de Kastle-Meyer sur le sang hémoglobinique des vertébrés, d'une part, et sur le sang hémocyanique des invertébrés, d'autre part.

Fleig a publié, à ce sujet, de très minutieuses recherches: le sang hémocyanique du *Carcinus mœnas* (crabe) ou, mieux, le sérum de ce sang, bleu par formation d'*oxyhémocyanine,* additionné d'alcool acétique et de réactif de Meyer, donne une coloration rose très nette, indice de l'oxydation de la phtaline par le cuivre; l'addition d'eau oxygénée augmente un peu, mais nettement, la teinte rosée. A noter également que l'extrait aqueux de foie de *Carcinus* donne une réaction de Meyer extrêmement intense. L'activité peroxydante particulièrement intense du foie est en rapport avec sa fonction martiale et sa « faculté de fixation élective pour le fer » étudiée par Dastre.

Au point de vue biologique général, il était intéressant de faire ces rapprochements et de constater que le *cuivre de l'hémocyanine* semble jouer le même rôle, dans ces réactions, que le fer de l'hémoglobine; de même qu'il était important de remarquer que, chez les crustacés et mollusques, *c'est le foie dont le pouvoir de peroxydation est le plus marqué,* ce fait s'expliquant par sa richesse spéciale en fer.

RESUME ET CONCLUSIONS

Les principales conclusions à tirer de cette étude ont été exposées successivement au cours des divers chapitres. Il nous suffira donc ici de les grouper brièvement et de montrer l'intérêt pratique général qui leur est lié.

I

A l'heure actuelle, *la réaction de Kastle-Meyer* est certainement une des plus employées pour la recherche du sang dans l'urine et dans d'autres milieux organiques. Cette méthode, qui utilise la propriété possédée par la phénolphtaline de s'oxyder par suite de la décomposition de l'eau oxygénée, sous l'influence de la matière colorante du sang, perd de sa sensibilité dans l'urine. La sensibilité paraît même d'autant plus diminuée que l'urine est plus dense ; dès lors, elle peut être positive avec des urines très peu chargées en globules sanguins, mais peu denses, et négative, avec des urines bien plus hématuriques, mais plus denses. Cette constatation a amené Telmon à trouver un agent, l'alcool acétique (alcool à 90 degrés, 98 cc. ; acide acétique cristallisé, 2 cc.) dont l'addition à l'urine rend la réaction *presque* aussi sensible que dans l'eau distillée.

Par quel mécanisme l'alcool acétique arrive-t-il à sensibiliser la réaction de Meyer? Nous avons vu que, d'après Telmon et Sardou, l'alcool favoriserait l'hémolyse et l'oxy-

dation, l'acool acétique amorcerait l'oxydation et faciliterait l'apparition de la réaction. Nos recherches nous ont permis d'analyser d'un peu plus près ce mécanisme, et l'ensemble de faits que nous rapportons dans le courant de cette étude *montre que le principal agent intervenant dans le mécanisme de la sensibilisation est l'alcool, mais aussi que le rôle de l'acide acétique n'est pas négligeable, puisqu'il accélère l'apparition de la réaction, stabilise davantage la coloration obtenue et permet d'obtenir une réaction positive dans les urines faiblement hématiques où l'alcool seul était insuffisant à déclancher la réaction.*

Nous avons également essayé de voir, par une série d'expériences, si cette action sensibilisante n'était pas en rapport avec un *processus d'hématinisation.* Or, on sait que les *alcools acides,* en général, ont la propriété d'hématiniser très rapidement l'hémoglobine, dissoute ou fixée, sur le globule rouge: la conclusion générale de ces séries d'expériences, *c'est que l'action sensibilisante de l'alcool acétique ne résulte pas de son action hématinisante, mais bien d'une diminution des facteurs de décoloration de la phénolphtaléine* (formée déjà dans la « réaction d'amorce à blanc » dans le cas du milieu eau distillée au lieu d'urine); l'alcool acétique a une action antagoniste vis-à-vis de la décoloration due au pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin, vis-à-vis de celle due à la forte alcalinité du mélange d'urine et de réactif de Meyer, vis-à-vis de celle due à l'eau oxygénée et vis-à-vis de celle due au zincate de potasse formé dans la préparation du réactif de Meyer.

Nous avons constaté que des *urines polyuriques,* sans traces de sang, peuvent donner la réaction de Meyer sensibilisée. Il faut, pour éliminer la cause d'erreur, faire une réaction témoin avec l'eau distillée.

Pour les *urines purulentes,* nous avons noté que, pour dissocier l'action peroxydasique hémoglobinique des actions peroxydasiques leucocytaires ou sériques possibles, il faut porter l'urine à l'*ébullition.*

Les moyens de sensibilisation étudiés soulignent, d'une part, les précautions techniques importantes *pour éviter diverses causes d'erreur de la réaction de Meyer originelle ou modifiée* (examen de la densité urinaire et conséquences, épreuves témoins, chauffage l'urine), ou, pour obtenir le maximum de sensibilité (épreuves aux doses d'acide et d'alcool variables, alcools, acides divers) ; ils montrent, d'autre part, *les modifications probables à apporter dans l'interprétation des résultats cliniques de la réaction de Meyer originelle,* en particulier au point de vue de la distinction de Paisseau et Tixier entre *les néphrites dégénératives et congestives,* ces dernières passant pour s'accompagner seules d'une réaction positive. Les antiseptiques utilisés pour la conservation des urines (thymol, oxycyanure de mercure) ne modifient en rien l'interprétation de la réaction de Meyer, sensibilisée ou non.

II

L'étude détaillée de la *réaction à la fluorescine* « réaction de Fleig », pour la recherche du sang dans l'urine, nous a permis de conclure à son action beaucoup plus sensible que celle de la réaction de Meyer. La réaction de Fleig présente, d'autre part, divers avantages :

La réaction à la *fluorescine* est, dans l'urine, *infiniment* plus sensible que la réaction de Meyer originelle et permet de déceler des proportions de sang de 1 p. 1.000.000 environ.

Contrairement à ce qui a lieu pour la réaction de Meyer originelle, *l'urine n'a qu'un pouvoir atténuant extrêmement minime vis-à-vis de la sensibilité de la réaction à la fluorescine.*

L'alcool acétique n'a, vis-à-vis de la réaction à la *fluorescine,* qu'un pouvoir sensibilisateur très faible ou nul ; ce qui était à prévoir, étant donné son mode d'action vis-à-vis de la réaction de Meyer.

Un avantage de « *la réaction de Fleig* » est de ne pas donner de « réactions à blanc » dans l'urine, puisqu'on n'a pas à employer, pour la sensibiliser, d'alcool acétique qui cause justement ces « *réactions à blanc* ».

Les urines de très faible densité (*urine polyurique*) qui peuvent, bien que ne contenant pas de sang, donner des « réactions à blanc » avec le réactif de Meyer en présence d'alcool acétique, ne donnent aucune réaction avec le réactif à la *fluorescine.*

Les urines purulentes, après ébullition (destruction des peroxydases leucocytaires, sériques ou bactériennes), donnent, suivant la quantité de globules rouges qu'elles contiennent, des réactions plus ou moins marquées.

Appliquée *dans l'urine,* la « réaction de Fleig » reste *spécifique du sang,* l'urine normale ou pathologique ne contenant pas d'éléments susceptibles de donner la réaction.

Le thymol et l'oxycyanure de mercure sont également sans action spéciale sur la réaction à la fluorescine.

III

Nous avons appliqué la réaction de Meyer, sensibilisée ou non, et la réaction à la fluorescine, à la recherche du sang dans divers milieux biologiques, tels que le liquide

céphalo-rachidien, les liquides d'ascite, les liquides pleurétiques, la salive, les crachats, les fèces. On opère exactement comme pour l'urine, et la présence du sang est nettement mise en évidence.

Au point de la recherche médico-légale des taches de sang, il faut admettre, au point de vue pratique, qu'il sera toujours utile de traiter des taches suspectes d'être d'origine sanguine par la réaction de Kastle-Meyer ou la réaction de Fleig. L'absence de coloration pourra constituer une preuve que la tache n'était pas formée de sang, mais la certitude viendra de la constatation des cristaux d'hématine examinés au microscope.

IV

L'étude des deux réactions phtaliniques : la réaction de Meyer, sensibilisée ou non, et la réaction de Fleig, nous a permis de voir, par de nombreuses expériences, leur grande sensibilité.

Au point de vue clinique, ces deux réactions nous ont permis de déceler des hématuries ou des hémoglobinuries extrêmement faibles. Le fait est très important dans les *néphrites,* où la quantité de sang de l'urine est quelquefois minime et passe inaperçue, alors que, si elle était révélée, elle pourrait être la source d'indications thérapeutiques très fécondes.

On peut en dire de même, en ce qui concerne le diagnostic de l'hématurie chez les *lithiasiques,* ou plutôt, chez les malades atteints *de diathèse lithiasique,* chez lesquels cependant un exercice violent ou une marche peut provoquer le passage dans l'urine d'une quantité de sang qui, pour n'être quelquefois que très minime, n'en reste pas moins

un élément des plus importants et des plus nécessaires à connaître.

De même encore, pour les hématuries minimes des *tuberculoses rénales* au début, des *tumeurs malignes du rein* qui sont un élément précieux de diagnostic.

Une autre conséquence, susceptible de modifier peut-être beaucoup les résultats cliniques de la réaction de Meyer et des déductions théoriques pathogéniques qu'on a cru pouvoir en tirer au point de vue de la *classification des néphrites,* est la suivante: d'après Paisseau et Tixier, la réaction de Meyer originelle serait positive ou négative, suivant que l'on serait en présence *d'une néphrite congestive ou d'une néphrite dégénérative.*

Nous n'avons pas eu l'occasion d'essayer, sur ces deux catégories de néphrites, la réaction de Fleig ou la réaction de Meyer sensibilisée. Or rien ne nous permet de dire jusqu'à présent, de façon catégorique, que les néphrites dégénératives ne s'accompagnent pas de la présence du sang dans l'urine, à l'inverse des néphrites congestives, et de nouvelles recherches s'imposent dans ce sens.

Ces quelques aperçus de chimie clinique montrent combien peut se modifier l'interprétation clinique à la lumière d'une réaction très sensible. Il est utile de ne point les perdre de vue si l'on veut éviter des erreurs qui peuvent être importantes à la fois au point de vue *pratique* et au point de vue *théorique.*

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Nous nous dispensons de donner, dans cet index, la bibliographie des travaux initiaux sur la question, ces derniers se trouvant indiqués dans les travaux des auteurs que nous citons.

Albarran, Hetz-Boyer. — Procédé simple pour la recherche du sang dans les urines. Presse médicale, 19 mai 1909.

Cestan (R.). — La recherche du sang par les procédés de la benzidine et de la phénolphtaléine. Archives médicales de Toulouse, 15 mars, 1er avril 1909.

Daskaloff. — Sur les nouveaux procédés du diagnostic des taches de sang. Thèse de médecine, Montpellier, 1909.

Delearde et Benoit. — Sur un nouveau procédé chimique de la recherche du sang. Compt. Soc. biol., 12-19 juin 1908. Echo médical du Nord, t. XII, p. 136. 5 juillet 1908.

Feuillié (E.). — Albuminuries et réactions de Meyer. C. r. Soc. biol., séance du 7 janv. 1910, p. 779-780, n° 16, t. LXVIII.

Fleig. — Des agents sensibilisateurs de la réaction à la phénolphtaline pour la recherche du sang dans l'urine. C. r. Soc. biol., LXVIII, 4 juin 1910, p. 972.

Fleig. — Nouvelle réaction à la fluorescine pour la recherche du sang, en particulier dans l'urine. C. r. Soc. biol., LXIX, 23 juillet 1910, p. 192.

— Sur la réaction à la phénolphtaline sensibilisée par les alcools-acides, dans les urines de diverses natures. C. r. Soc. biol., LXIX, 30 juillet 1910, p. 222.

Labat. — Sur la recherche du sang en clinique et en médecine légale. Gazette hebdom. des Sc. médicales de Bordeaux, 29 nov. 1908.

Paisseau et Tixier (Léon). — A propos de la réaction de Meyer dans les néphrites. C. r. Soc. biol., 19 mars 1910.

— A propos des néphrites congestives et dégénératives. C. r. Soc. biol., 21 mai 1910, p. 884-885, n° 18, t. LXVIII.

Pozzi et Escot. — Emploi de la phénolphtaléine comme réactif du sang. Bull. Soc. chirurg. Belgique, t. XXII, p. 415-416.

Puy le Blanc. — Procédé pratique pour la recherche du sang dans les urines. Thèse de Paris, 1909.

Sangouard. — La réaction peroxydasique à la phénolphtaline sensibilisée ou non dans divers liquides organiques. C. r. Soc. biol., 18 juin 1910, t. LXVIIII, p. 1042.

— Sur la réaction à la phénolphtaline, sa sensibilisation et sur une nouvelle réaction à la fluorescine pour la recherche du sang dans l'urine et dans divers liquides organiques. (Mémoire ayant obtenu le prix Swiécicki à la Faculté de médecine de Montpellier, 31 mai 1910.) Cité *in* Montpellier médical, 15 sept. 1912, n° 37, p. 268, t. XXXV.

Sarda et Brunel. — De quelques réactions colorées du sang. *In* Montpellier médical, 17 avril 1910, t. XXX, 2e série, p. 361-365.

Sardou. — Recherche clinique du sang dans l'urine. Thèse Montpellier, 18 avril 1910, n° 44.

Telmon et Sardou. — Etude de la réaction à la phénolphtaline pour la recherche du sang dans l'urine. Soc. sc. médicales Montpellier, 28 janvier 1910. Paru *in* Montpellier médical, XXX (2e série), 27 mars 1910, p. 306-309.

Ville et Moitessier. — Action du sang sur l'eau oxygénée. Bull. Soc. chirurg. de Paris, t. XXVII, p. 1003.

— Sur la séparation des principes décomposant l'eau oxygénée contenus dans les hématies. Bull. Soc. chirurg. de Paris, 1903, t. XXIX, p. 978.

Willenz. — Sur la recherche du sang par les procédés chimiques. Bull. Soc. ph. Bordeaux, 1906.

— Recherche du sang dans les urines, les matières fécales et dans les divers liquides de l'organisme. Union pharmaceutique, 15 octobre 1909.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 19 décembre 1914.
Le Recteur,
Ant. BENOIST.

Vu et approuvé :
Montpellier, le 19 décembre 1914
Le Doyen,
MAIRET.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

Introduction..... 1

PREMIÈRE PARTIE

Principales données actuellement acquises sur la réaction de Meyer pour la recherche du sang dans l'urine et sur les modifications de cette réaction. 5

DEUXIÈME PARTIE

Recherches sur la réaction de Meyer dans l'urine, les dilutions aqueuses du sang, d'hémoglobine ou d'hématine et sur les modifications de cette réaction. — Applications cliniques. 13

I. — De quelques agents autres que le sang pouvant oxyder le réactif de Meyer..... 13

II. — Réaction de Meyer originelle ou modifiée (par addition d'alcool acétique) sur des dilutions sanguines aqueuses et sur des urines de diverses natures. — Sensibilité..... 16

1° *Dilutions sanguines aqueuses*..... 16

2° *Urines diverses, à éléments anormaux, médicamenteux ou pathologiques*..... 17

Sensibilité comparée dans les diverses urines et dans l'eau..... 17

3° *Recherche des composés urinaires retardant la réaction de Meyer*..... 17

4° *Urines polyuriques. — Nécessité d'une épreuve témoin. — Sa valeur*..... 21

Utilisation de l'action empêchante de l'urine normale pour supprimer les « réactions à blanc » dans les urines polyuriques ne contenant pas de sang..... 21

5° *Urines purulentes. — Dissociation de l'action peroxydasique hémoglobinique et des actions peroxydasiques leucocytaires ou sériques possibles*..... 24

PAGES

III. Mécanisme de l'action sensibilisante de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer 25

1° *L'action sensibilisante est-elle en rapport avec une augmentation de l'hémolyse?* 26

2° *Recherche d'une action sensibilisante de l'acide acétique seul, de l'alcool seul. — Comparaison de l'action sensibilisante de l'alcool seul et de celle de l'alcool acétique* ... 28

3° *Influence de la dose d'acide acétique. — Influence corrélative des variations de composition de l'urine* 31

4° *Influence de la dose d'alcool. — Influence corrélative de la quantité de sang dans l'urine* 32

5° *Influence de l'ordre du mélange des composés entrant dans la réaction* 38

6° *Action sensibilisante d'acides et d'alcools autres que l'acide acétique et l'alcool éthylique et de divers sels. — Doses respectives* 39

7° *Nouvelles modifications à apporter à la réaction de Meyer sensibilisée, en vue d'obtenir le maximum d'intensité* 40

8° *Utilisation des données précédentes pour l'explication du mécanisme de l'action sensibilisante de l'alcool acétique. — Celle-ci est-elle en rapport avec un processus d'hématinisation?* 42

a) Action de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer faite sur l'hématine elle-même en solution urinaire ou alcaline, chauffée et non chauffée 43

b) Action du chauffage en milieu alcoolique ou alcoolique acétique sur les dilutions sanguines hémoglobiniques, aqueuses ou urinaires 46

c) Action du chauffage préalable en milieu alcalin sur les dilutions sanguines ou hémoglobiniques, aqueuses ou urinaires 46

d) Action de l'alcool acétique dans la réaction de Meyer effectuée comparativement sur des solutions équimoléculaires d'hémoglobine ou d'hématine 47

9° *L'alcool acétique augmente la sensibilité de la réaction de Meyer en diminuant l'action des facteurs de décoloration de la phénolphtaléine, formée déjà dans la « réaction d'amorce à blanc »* 48

A. *Etude des facteurs de décoloration* 49

a) Dans l'urine 49

b) Dans les solutions aqueuses d'hémoglobine ou d'hématine 50

c) Dans le cas de la décoloration de la « réaction à blanc » dans l'eau distillée 50

PAGES

B. *Action antagoniste de l'alcool acétique vis-à-vis des facteurs de décoloration. — Importance respective de l'alcool seul, de l'acide acétique seul, et de l'alcool acétique dans cette action antagoniste* 57

α) Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due au pouvoir réducteur de l'urine en milieu alcalin 57

β) Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due à la forte alcalinité du mélange d'urine et de réactif de Meyer 58

γ) Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due à H^2O^2 58

δ) Action de l'alcool acétique antagoniste de la décoloration due au zincate de potasse 59

a) Acide acétique seul 59

b) Alcool seul 60

c) Alcool acétique 61

IV. — De quelques modifications du réactif de Meyer 61

V. — Activité peroxydasique (vis-à-vis du réactif de Meyer) du fer hématique suivant la complexité de sa combinaison moléculaire 63

1° *Comparaison de l'activite peroxydasïque de solutions équimoléculaires d'hématine, d'hémoglobine et de dilutions de sang frais correspondant à un taux hématinique certainement inférieur à celui des solutions précédentes* 65

α) Préparation des solutions équimoléculaires d'hématine et d'hémoglobine 65

β) Préparations des dilutions de sang *total* frais de chien, correspondant à un taux hématinique certainement inférieur à celui des solutions précédentes 66

γ) Réactions comparatives avec les diverses solutions 67

2° *Comparaison de l'action peroxydasique de dilutions de sang frais, total ou défibriné, laqué ou non laqué, de dilutions de globules lavés laqués ou non laqués et de sang fraîchement hématinisé* 69

α) Préparation des dilutions sanguines 70

β) Réactions comparatives avec les diverses solutions ... 72

γ) Activité peroxydasique de l'*hématine ancienne*, isolée chimiquement, et de l'*hématine néoformée*, non isolée de la solution où elle a pris naissance 73

VI. Des modifications apportées dans les résultats cliniques de la réaction de Meyer par les moyens de sensibilisation étudiés 76

PAGES

TROISIÈME PARTIE

Recherches sur une nouvelle réaction du sang dans l'urine et les dilutions aqueuses de sang par la Fluorescine « Réaction de Fleig ». 81

I. — Mécanisme de la réaction à la fluorescine. — Réactifs. — Technique de son application dans l'urine 82

II. — Sensibilité de la réaction. — Essais de sensibilisation par l'alcool acétique. — Sensibilité comparée de la réaction de Meyer avec ou sans alcool acétique et de la réaction à la fluorescine, dans des dilutions sanguines, aqueuses et urinaires.. 84

III. — Réaction à la fluorescine dans diverses urines pathologiques. — Urines polyuriques. — Urines purulentes 87

IV. — Activité peroxydasique du fer suivant la complexité de sa combinaison moléculaire, étudiée au moyen de la réaction à la fluorescine 89

V. — Autres phtalines 89

VI. — Intérêt clinique de la réactien à la fluorescine 90

1° Simplicité et rapidité d'exécution. — Facilité d'observation. 91

2° Absence de résultats positifs dans des urines polyuriques ne contenant pas de sang 91

3° Stabilité des colorations ; absence de décoloration 92

4° Possibilité, étant donnée la stabilité de la fluorescence, d'un dosage clinique du sang dans l'urine 92

QUATRIÈME PARTIE

Applications des réactions de la phénolphtaline et de la fluorescine à la recherche du sang dans divers milieux organiques. 95

I. — Liquide céphalo-rachidien 96

II. — Liquide d'ascite 97

III. — Liquide pleurétique 98

IV. — Sperme. — Salive. — Crachats 99

V. — Fecès (carnivores et herbivores) 100

VI. — Méconium 100

VII. — Taches de sang plus ou moins anciennes 101

VIII. — Hémocyanine 102

Résumé et conclusions 105

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leur enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

PAGES

TROISIÈME PARTIE

Recherches sur une nouvelle réaction du sang dans l'urine et les dilutions aqueuses de sang par la Fluorescine « Réaction de Fleig ». 81

I. — Mécanisme de la réaction à la fluorescine. — Réactifs. — Technique de son application dans l'urine 82
II. — Sensibilité de la réaction. — Essais de sensibilisation par l'alcool acétique. — Sensibilité comparée de la réaction de Meyer avec ou sans alcool acétique et de la réaction à la fluorescine, dans des dilutions sanguines, aqueuses et urinaires.. 84
III. — Réaction à la fluorescine dans diverses urines pathologiques. — Urines polyuriques. — Urines purulentes 87
IV. — Activité peroxydasique du fer suivant la complexité de sa combinaison moléculaire, étudiée au moyen de la réaction à la fluorescine 89
V. — Autres phtalines 89
VI. — Intérêt clinique de la réactien à la fluorescine 90
1° Simplicité et rapidité d'exécution. — Facilité d'observation. 91
2° Absence de résultats positifs dans des urines polyuriques ne contenant pas de sang 91
3° Stabilité des colorations ; absence de décoloration 92
4° Possibilité, étant donnée la stabilité de la fluorescence, d'un dosage clinique du sang dans l'urine 92

QUATRIÈME PARTIE

Applications des réactions de la phénolphtaline et de la fluorescine à la recherche du sang dans divers milieux organiques. 95

I. — Liquide céphalo-rachidien 96
II. — Liquide d'ascite 97
III. — Liquide pleurétique 98
IV. — Sperme. — Salive. — Crachats 99
V. — Fecès (carnivores et herbivores) 100
VI. — Méconium 100
VII. — Taches de sang plus ou moins anciennes 101
VIII. — Hémocyanine 102
Résumé et conclusions 105

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leur enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !